

**UNTERSUCHUNGEN ZUM INKORPORATIONSVERHALTEN
UND ZUR AGGREGATION WASSERLÖSLICHER KANALBILDNER
IN PLANAREN LIPIDMEMBRANEN AM BEISPIEL VON
PHALLOPORIN AUS AMANITA PHALLOIDES UND
RUBESCENSPOIN AUS AMANITA RUBESCENS**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Hans Ulrich Wilmsen

Bochum 1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNTERSUCHUNGEN ZUM INKORPORATIONSVERHALTEN
UND ZUR AGGREGATION WASSERLÖSLICHER KANALBILDNER
IN PLANAREN LIPIDMEMBRANEN AM BEISPIEL VON
PHALLOPORIN AUS AMANITA PHALLOIDES UND
RUBESCENSPORIN AUS AMANITA RUBESCENS

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Hans Ulrich Wilmsen

Bochum 1987

Referent: Prof. Dr. G. Boheim
Korreferent: Prof. Dr. J. W. Deitmer
Tag der mündlichen Prüfung: 15. Dezember 1987

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Einleitung

1.1	Biologische Membranen	1
1.1.1	Transportsysteme in biologischen Membranen	5
1.1.2	Carrier	5
1.1.3	Membrankanäle	7
1.1.4	Die Patch-clamp-Technik	8
1.1.5	Reaktionskinetik schaltender Ionenkanäle	10
1.1.6	Spannungsabhängige und ligandenabhängige Ionenkanäle	15
1.1.7	Der nikotinerge Acetylcholinrezeptor (nAChR) als Beispiel eines biologischen Membrankanals	17
1.2	Modellsysteme	
1.2.1	Künstliche planare Lipidmembranen	21
1.2.2	Einbau von Transportsystemen in planare Lipidmembranen	22
1.2.2.1	Einbau von wasserlöslichen Kanalbildnern	22
1.2.2.2	Rekonstitution integraler biologischer Membrankanäle	23
1.3	Wasserlösliche cytolytische Toxine	24
1.3.1	Kanalbildende Colicine	25
1.3.2	Alamethicin	26
1.3.3	Cytolytische und kanalbildende Proteine in Pilzen der Gattung Amanita	31
1.3.3.1	Phallolysin	31
1.3.3.2	Rubescenslysin	32
1.3.3.3	Phalloporin und Rubescensporin	32
1.4	Problemstellung	37

2. Material und Methoden

2.1	Chemikalien	
2.1.1	Feinchemikalien und Lösungsmittel	39
2.1.2	Kanalbildende Substanzen	39
2.1.3	Lipide	40
2.2	Experimentelles	
2.2.1	Planare Lipidmembranen	
2.2.1.1	Mueller-Rudin-Technik	41
2.2.1.2	Montal-Mueller-Technik	42
2.2.2	Die Meßapparatur	
2.2.2.1	Mechanischer Aufbau	45
2.2.2.2	Reinigungsschritte	49
2.2.2.3	Perfusionsmethode	49
2.2.2.4	Elektronischer Aufbau	51
2.3	Auswertung der Versuchsdaten	
2.3.1	Statistische Computerauswertung	54
2.3.2	Auswertung von Schreiberregistrierungen	55
2.4	Vorzeichenkonvention und Applikation von Kanalbildnern	56

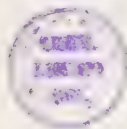
3. Ergebnisse

3.1	Phalloporin	
3.1.1	Einbau in planare Lipidmembranen	
3.1.1.1	Spannungsinduzierter Einbau bei neutralem pH	57
3.1.1.2	pH-Abhängigkeit der Einbauparameter	59
3.1.1.2.1	Nähere kinetische Betrachtungen	65
3.1.1.2.2	Die pH-Abhängigkeit der Verzögerungszeit t_{lag}	68

	Seite
3.1.1.2.3 Die pH-Abhängigkeit der maximalen Einbaurrate $(\Delta N/\Delta t)_{\max}$...	72
3.1.1.2.4 Die pH-Abhängigkeit von N_{45}	72
3.1.1.2.5 Henderson-Hasselbalch-Darstellung des Phalloporineinbaus ..	72
3.1.1.3 Die Konzentrationsabhängigkeit der Einbauparameter	76
3.1.1.3.1 Die Konzentrationsabhängigkeit der Verzögerungszeit t_{lag} ..	76
3.1.1.3.2 Die Konzentrationsabhängigkeit von N_{45}	76
3.1.1.3.3 Die Konzentrationsabhängigkeit der maximalen Einbaurrate $(\Delta N/\Delta t)_{\max}$	82
3.1.1.3.4 Die Konzentrationsabhängigkeit der Geschwindigkeits- konstanten λ_1 und λ_2	82
3.1.2 Die elektrischen Eigenschaften phalloporinhaltiger Membranen	82
3.1.2.1 Strom-Spannungs-Kennlinien phalloporinhaltiger Membranen	86
3.1.2.2 Die Spannungsabhängigkeit der phalloporininduzierten Membranleitfähigkeit	88
3.1.2.3 Korrelation zwischen der Spannungsabhängigkeit des Vielkanal- und Einzelkanalsystems	88
3.1.3 Spannungsinduzierte Inaktivierung von Phalloporinkanälen bei niedrigen pH-Werten	92
3.1.3.1 Die Zeit- und Spannungsabhängigkeit des Inaktivierungsstroms	95
3.1.3.2 Inaktivierung des Einzelkanals	99
3.1.3.3 pH-abhängige Recovery nach spannungsinduzierter Inaktivierung	101
3.1.4 Weitere Eigenschaften des Phalloporinkanals	104
3.1.4.1 Permeabilität für Na^+ - und Cl^- -Ionen	105
3.1.4.2 Permeabilitätsverhältnis zwischen Li^+ - und Na^+ -Ionen	106
3.1.4.3 Permeabilitätsverhältnisse des Phalloporinkanals zwischen Na^+ - und den zweiwertigen Kationen Ca^{++} , Ba^{++} und Mg^{++}	109
3.1.4.4 Der Einzelkanalleitwert des Phalloporins bei unterschiedlichen Elektrolytleitfähigkeiten	112

	Seite
3.1.4.5 Die pH-Abhängigkeit des Einzelkanalleitwertes	112
3.1.4.6 Ein zweiter Kanaltypus in Proteinextrakten von Amanita phalloides	116
3.2 Rubescensporin	
3.2.1 Einbau in planare Lipidmembranen	119
3.2.1.1 Die Spannungsabhängigkeit des Vielkanaleinbaus	122
3.2.1.2 Inaktivierung der rubescensporininduzierten Membran- leitfähigkeit durch hohe positive Membranspannungen	126
3.2.1.3 Spannungssprungsexperimente an rubescensporindotierten Lipidmembranen	126
3.2.1.4 Die Verzögerungszeit t_{lag}	129
3.2.1.5 Die pH-Abhängigkeit des Vielkanaleinbaus	135
3.2.1.6 Die Konzentrationsabhängigkeit des Vielkanaleinbaus	135
3.2.1.7 Perfusionsexperimente an rubescensporindotierten Membranen	137
3.2.2 Einzelkanalstruktur des Rubescensporins	142
3.2.2.1 Die Einzelkanalstruktur des Rubescensporins bei Variation des pH-Wertes	144
3.2.2.2 Spannungs- und pH-Abhängigkeit des Rubescensporineinzelkanals (qualitativ)	149
4. Diskussion	
4.1 Untersuchung der kanalbildenden Proteine Phalloporin und Rubescensporin in planaren künstlichen Lipidmembranen	152
4.2 Einbau von Phalloporin und Rubescensporin in künstliche planare Lipidbilayer	153
4.2.1 Phalloporin	153
4.2.2 Rubescensporin	157
4.3 Konzentrationsabhängigkeit	
4.3.1 Phalloporin	159
4.3.2 Rubescensporin	164

	Seite
4.4 Perfusionsexperimente an phalloporin- und rubescensporin-dotierten Lipidmembranen	167
4.5 Einzelkanalverhalten	
4.5.1 Phalloporin	169
4.5.2 Rubescensporin	172
4.6 Makroskopische elektrische Eigenschaften phalloporin- und rubescensporindotierter Lipidmembranen	
4.6.1 Korrelation zwischen makroskopischer Membranleitfähigkeit phalloporindotierter Membranen und Einzelkanalverhalten ...	178
4.6.2 Inaktivierungsexperimente mit Phalloporin	187
4.6.3 Rubescensporin	189
4.7 Ionenpermeabilitäten	
4.7.1 Phalloporin	191
4.7.2 Rubescensporin	193
4.8 Cytolytische Aktivitäten	194
4.8.1 Phalloporin und Phallolysin	194
4.8.2 Rubescensporin und Rubescenslysin	195
5. Zusammenfassung	199
6. Anhang	
6.1 Kinetik des Phalloporineinbaus	202
6.2 Die Henderson-Hasselbalch-Beziehung	205
6.3 Ionenpermeabilitäten zweiwertiger Ionen	207
6.4 Aggregationsmechanismus von Rubescensporin in planaren Lipidmembranen	209
7. Literaturverzeichnis	213



1. Einleitung

1.1 Biologische Membranen

Alle lebenden Zellen sind durch geschlossene Membransysteme an ihrer Oberfläche gegen ihre Umgebung abgegrenzt. Aufgabe von Membranen ist in erster Linie eine Kompartimentierung und somit die Schaffung abgeschlossener Reaktionsräume, die für elementare Lebensprozesse unerlässlich sind. Sie können als hochselektive Permeabilitätsschranken angesehen werden, die für die Einhaltung eines konstanten intrazellulären Ionenmilieus sorgen. Biologische Membranen besitzen dazu charakteristische, hochspezifische Transportsysteme, die einen kontrollierten Stofftransport in die Zelle und aus ihr heraus gewährleisten und dadurch für die Aufrechterhaltung lebenswichtiger Stoffwechselprozesse sorgen (Diamond und Wright, 1969). Ferner sind die Plasmamembranen dazu spezialisierter Zellen die Träger der Fortleitung elektrochemischer Signale und bilden damit die Grundlage sowohl für eine Verarbeitung äußerer physikalisch-chemischer Reize als auch für eine biologische Kommunikation zwischen den Zellen. Unabdingbare Voraussetzung hierfür sind ihre selektiven Ionenpermeabilitäten, die für das Entstehen von elektrischen Potentialdifferenzen zwischen Zellinnerem und -äußerem verantwortlich sind. Solche erregbaren Membranen sind charakteristisch für Nerven- und Muskelzellen (Katz, 1966; Kuffler und Nicholls, 1976).

Die beiden wichtigsten biologischen Energiegewinnungsprozesse, die Photosynthese und die oxidative Phosphorylierung, laufen ebenfalls an den geschlossenen Membransystemen der Chloroplasten und Mitochondrien ab (Lehninger, 1974).

Schließlich sind Zellmembranen Träger von art- und zellspezifischen Oberflächeneigenschaften, die auf musterartig verteilten Mucopolysacchariden und Proteinen beruhen. Diese Stoffe bestimmen im wesentlichen die Immunreaktion (Davis et al., 1973).

In biochemischer Hinsicht bestehen biologische Membranen hauptsächlich aus Lipiden und Proteinen, deren relativen Anteile zellspezifisch sind. Die wichtigsten Membranlipide sind Phosphoglyceride, Sphingomyeline und Steroide (Lehninger, 1977).

Membransysteme können sich spontan in einem Self-assembly-Prozeß aus ihren Komponenten bilden. Diese Grundeigenschaft beruht auf dem amphipathischen

Charakter vor allem der Phosphoglyceridmoleküle, die neben unpolaren Kohlenwasserstoffketten auch polare Gruppen enthalten. Dadurch werden sie in die Lage versetzt, in wäßrigen Phasen lamellare, bimolekulare Schichten, sogenannte *Bilayer* zu bilden. Die treibende Kraft zu diesem Prozeß ist das Bestreben der umgebenden Wassermoleküle, durch Vermeiden des Kontaktes mit unpolaren Gruppen einen Zustand maximaler Entropie anzunehmen. Dadurch werden die Phosphoglyceridmoleküle gezwungen, sich so anzuordnen, daß sich ihre hydrophoben Kohlenwasserstoffketten durch Selbstaggregation von den Wassermolekülen abgrenzen. Lipidbilayer werden durch nicht kovalente Van der Waals' sche Wechselwirkungen zusammengehalten und sind um einen Zusammenschluß mit sich selbst bemüht, woraus die Bildung abgeschlossener Kompartimente resultiert (Singer, 1974). Die häufigsten Phosphoglyceride in biologischen Membranen sind Phosphatidylcholin, Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylserin.

Die Membranproteine werden in zwei Kategorien eingeteilt: Die sogenannten *integralen* oder *intrinsischen* Proteine sind fest in dem Lipidanteil eingebettet und können nur durch drastische Methoden von ihm isoliert werden. Die äußeren *extrinsischen* oder *peripheren* Proteine sind nur locker an die Membranoberfläche gebunden und können durch milde Extraktionsverfahren abgelöst werden.

Über die Struktur biologischer Membranen herrschte lange Unklarheit, ja ihre Existenz konnte zunächst wegen ihrer geringen Dicke nur indirekt durch physikalische und physiologische Experimente nachgewiesen werden (Nägeli, 1884; Pfeffer, 1899; Overton, 1902). Einen ersten Vorschlag eines Membranstrukturmodells machten Gorter und Grendel (1925). Anhand von Spreitungsexperimenten mit aus Erythrozytenghosts isolierten Lipiden auf Wasseroberflächen konnten sie zusammen mit Flächenberechnungen zeigen, daß die Lipide in der Membran in der Form eines Bilayers zweier monomolekularer Schichten von Lipidmolekülen angeordnet sein mußten. Danielli und Davson (1935) gingen ebenfalls von einer kontinuierlichen Kohlenwasserstoffphase aus, berücksichtigten dabei aber die Verteilung des Proteinanteils.

Mit der fortschreitenden Entwicklung der Elektronenmikroskopie gelang es schließlich, biologische Membranen optisch darzustellen (Robertson, 1959, 1960). Robertson entwickelte daraufhin ein *Unit-membrane-Konzept*, demzufolge biologische Membranen aus einem Bilayer von Lipidmolekülen bestehen, wobei deren hydrophoben Kohlenwasserstoffketten gegeneinander orientiert sind und ihre hydrophilen polaren Köpfe in die wäßrige Phase ragen. Beiden

Oberflächen sollte eine monomolekulare Schicht von Protein aufgelagert sein. Grundlage dafür bot die in allen EM-Aufnahmen von Ultradünnschnitten fixierter Membranen auftretende trilamellare Struktur mit einer Dicke von etwa 75 Å (Robertson, 1960). Dieses und eine Reihe anderer Modelle (Stoeckenius und Engelman, 1967) konnten jedoch viele Eigenschaften biologischer Membranen noch nicht befriedigend erklären.

Das zur Zeit am meisten akzeptierte Strukturmodell ist das von Singer und Nicolson (1972) vorgeschlagene *Fluid-mosaic-membrane-Modell* (Abb. 1.1). In ihm sind die Membranlipide in einem Bilayer angeordnet und bilden eine flüssig-kristalline Matrix, in der sich die Lipidmoleküle relativ frei bewegen können. Membranproteine durchdringen den Lipidbilayer entweder in seiner gesamten Dicke (intrinsische Proteine) oder dringen nur mehr oder weniger in ihn ein. Untersuchungen mit Hilfe der optischen Rotationsdispersion und des Cirkulardichroismus deuten darauf hin, daß die Proteinmoleküle in der Membran einen hohen Anteil an α -Helix und deshalb eine globuläre Struktur haben. Wieweit die α -Helices von Membranproteinen in die Lipidphase hineinragen, wird durch die Aminosäuresequenz und die Lage der hydrophoben Reste bestimmt.

Zusammenfassend kann man sagen, daß biologische Membranen in ihrer Lipidphase zum größten Teil Phosphoglyceride enthalten. Diese bilden durch nichtkovalente Wechselwirkungen zusammengehaltene Bilayer, die die gleiche Dicke und viele Eigenschaften natürlicher Membranen zeigen wie z.B. eine hohe elektrische Kapazität. Man nimmt daher an, daß sie die Grundstruktur biologischer Membranen bilden. Dabei steht das Fluid-mosaic-membrane-Modell von Singer und Nicolson am besten im Einklang mit heute bekannten Charakteristika und Eigenschaften biologischer Membranen.

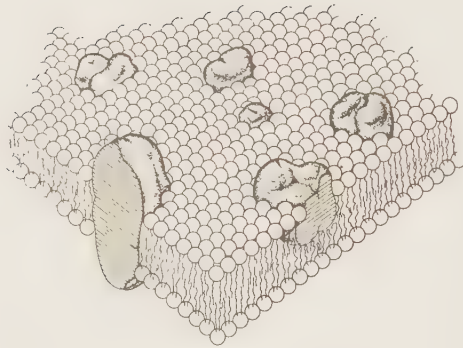


Abb. 1.1: Das Fluid-mosaic-membrane-Modell der Zellmembran. In einem fluiden Phospholipidbilayer sind in unregelmäßiger Anordnung periphere und intrinsische, globuläre Membranproteine eingebettet. Es gilt heute als gesichert, daß die Membranproteine die Träger der an biologischen Membranen beobachteten Transportphänomene sind, die sie entweder als Carrier- oder Kanalproteine erfüllen.

Aus Singer und Nicolson, 1972

1.1.1 Transportsysteme in biologischen Membranen

Es wird heute allgemein akzeptiert, daß ein Lipidbilayer die Grundstruktur der Zellmembranen aller lebenden Zellen ist. Eine kontinuierliche reine Kohlenwasserstoffphase in einer Membran hat jedoch einen hohen elektrischen Widerstand und stellt für die freie Diffusion polarer Substanzen zwischen den Kompartimenten eine hohe energetische Barriere dar. Hydratisierte Ionen müßten beim Durchtritt unter hohem Energieaufwand ihre Hydrathülle ganz oder teilweise abstreifen.

Zellmembranen besitzen deshalb hochspezifische Transportsysteme für solche Substanzen. Ihre Aufgaben sind u.a. die Regulation der intrazellulären Ionenzusammensetzung und des pH-Wertes, sie nehmen Bausteine des Stoffwechsels in die Zelle auf und sie halten Ionengradienten aufrecht, die wichtig für die Erregungsbildung und -fortleitung an erregbaren Zellen sind.

Man unterscheidet heute nach der Funktionsweise im allgemeinen zwei Kategorien solcher Transportsysteme: 1.) intramembranäre bewegliche Carrier und 2.) transmembranäre Kanalstrukturen. In allen bisher untersuchten Fällen konnten Membranproteine als Träger dieser Funktionen identifiziert werden.

1.1.2 Carrier

Im Fall des Carriertransports geht ein membrangebundenes Proteinmolekül auf einer Membranseite mit einem Substrat, z.B. einem Ion, einen Komplex ein und setzt dieses auf der anderen Seite wieder frei (Abb. 1.2). Der Transportprozeß erfolgt entweder durch Hin- und Herbewegung des Komplexes in der Membran, durch eine Konformationsänderung oder durch einfache Drehung. Dieser Transport kann unter Aufwendung von Stoffwechselenergie gegen einen Konzentrationsgradienten erfolgen - in diesem Fall spricht man von *aktivem Transport*. Das in biologischen Membranen am weitesten verbreitete Carriersystem ist die $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -Pumpe, ein membrangebundenes Protein, das mittels ATP-Hydrolyse K^+ in die Zelle hinein- und Na^+ herauspumpt (Kyte, 1972).

Zum Verständnis von Carriermechanismen hat wesentlich die Entdeckung einiger passiver Transportantibiotika beigetragen, für die ein Carriermechanismus nachgewiesen wurde. Das bekannteste unter ihnen ist wohl das Valinomycin, das sehr spezifisch einen Komplex mit K^+ -Ionen eingeht und dadurch die K^+ -Leitfähigkeit von Lipidmembranen um mehrere Größenordnungen

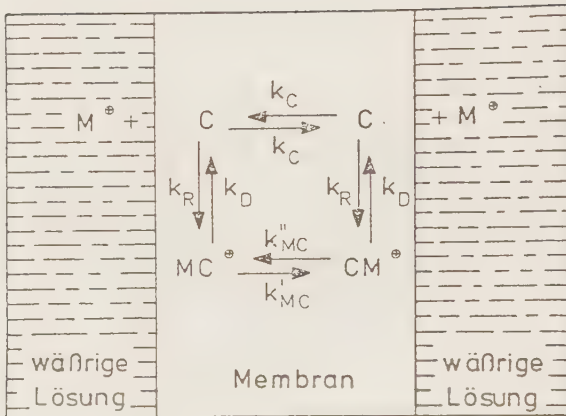


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des Carriermechanismus in einer Membran. Ein Ion M^+ bildet mit dem Carrier C einen Komplex MC^+ , wird in dieser Form auf die andere Membranseite transportiert und dort wieder freigesetzt. Der Reaktionszyklus schließt sich, indem der Carrier C unkomplexiert an die ursprüngliche Grenzfläche zurückdiffundiert und dort ein neues Ion aufnehmen kann. Als Carrier kann man sich ein in der Membrangrenzfläche befindliches Proteinmolekül denken, wie es in Abb. 1.1 dargestellt ist. In Erweiterung zu diesem Transportmechanismus ist ein Carriermechanismus denkbar, bei dem der Transport durch eine bloße Konformationsänderung oder einfache Drehung des Komplexes in der Membran erfolgt.
Aus Bamberg et al., 1974

zu erhöhen vermag (Mueller und Rudin, 1967; Läuger, 1972). Als Carrier für Alkaliionen wirken außerdem das Enniatin B und das Monactin (Shemyakin et al., 1969).

1.1.3 Membrankanäle

Man kann die Funktionsweise eines Carriers mit der eines Enzyms vergleichen, das die Reaktion - den Transport eines polaren Ions durch die hydrophobe Membran - dadurch beschleunigt, indem es die elektrostatische Energiebarriere erniedrigt. Die Wechselzahl für das Valinomycin beträgt etwa 10^4 K^+ -Ionen pro Sekunde. Da Valinomycin im Vergleich zu den viel größeren Carriermolekülen in biologischen Membranen ein relativ kleines Molekül ist, dürfte dieser Zahlenwert aufgrund der hohen Viskosität von Lipidmembranen als die obere Grenze dessen angesehen werden, was Carriersysteme überhaupt zu leisten vermögen (Läuger und Stark, 1970).

Bereits 1952 zeigten jedoch Hodgkin und Huxley im Rahmen ihrer berühmten Ionentheorie der Erregung aufgrund rein theoretischer Überlegungen, daß die Entstehung von Aktionspotentialen an Nervenzellen auf dem Öffnen und Schließen diskreter und getrennter Transportwege für Na^+ - und K^+ -Ionen, sogenannter Na^+ - und K^+ -Kanäle, beruhen muß. Durch Blockierungsexperimente mit hochspezifischen Giften ist man in der Lage, die Dichte dieser Kanäle auf Zellmembranen zu "titrieren" und die Ionendurchtrittsrates pro Einzelkanal zu errechnen. So blockiert das Tetrodotoxin (TTX) speziell die Na^+ -Leitfähigkeit an Nervenmembranen, wobei dieses Gift nur eine äußerst geringe Anzahl an Bindungsplätzen an der Membran besetzt (Levinson und Meves, 1975). Man schloß daraus, daß ein einziges TTX-Molekül mit hoher Affinität an einen Na^+ -Kanal bindet und diesen verschließt. Ähnlich blockierend wirkt Tetraäthylammonium (TEA) auf K^+ -Kanäle. Aus diesen Blockierungsexperimenten ergibt sich, daß im geöffneten Zustand etwa 10^7 Na^+ -Ionen pro Sekunde durch den Na^+ -Kanal strömen (Hille, 1984). Das ist etwa 10^3 mal soviel wie die Wechselzahl des Valinomycons, und es ist ausgeschlossen, daß der Na^+ -Kanal nach der Art eines Carriers wie das Valinomycin funktioniert. Solch hohe Durchtrittsrates lassen sich nur durch den Lipidbilayer überspannende, durchgehende Diffusionswege für Ionen erklären.

Mit Hilfe von Rauschmessungen des Membranstroms konnte man die Funktionsweise solcher Membrankanäle weiter aufklären. Setzt man ein bestimmtes kinetisches Verhalten eines Kanaltyps voraus, kann man mit Rauschanalysen

von Vielkanalsystemen charakterisierende Kenngrößen des Einzelkanals quantitativ bestimmen. Dazu zählen der *Einzelkanalleitwert*, also der elementare Anteil, den ein einzelner Kanal zur Gesamtleitfähigkeit beiträgt, sowie unter bestimmten Voraussetzungen die *mittlere Lebensdauer* des geöffneten Kanalzustandes (Neher und Stevens, 1977).

1.1.4 Die Patch-clamp-Technik

Eine direkte Analyse des Stroms durch einzelne Ionenkanäle in biologischen Membranen war vor der Entwicklung der *Patch-clamp-Technik* in der Mitte der siebziger Jahre nicht möglich. Bis dahin mußte man sich bei elektrophysiologischen Untersuchungen an erregbaren Zellen auf die *Voltage-clamp-Technik* beschränken, die im allgemeinen nur eine Messung zeit- und spannungsabhängiger Gesamtströme an Zellmembranen erlaubt. Generell wird die erreichbare Stromauflösung in elektrophysiologischen Messungen durch das Eigenrauschen der Meßanordnung begrenzt, zu dem das Widerstandsrauschen der Zelle und der Elektroden sowie das Eingangsrauschen des Verstärkers beitragen (Neher, 1974). Bei Voltage-clamp-Versuchen kommt zu einem nicht unerheblichen Anteil das Temperaturrauschen des Membranwiderstandes hinzu, dessen mittlere quadratische Amplitude $\overline{I^2(t)}$ gegeben ist durch (Bittel und Storm, 1971):

$$\overline{I^2(t)} = \frac{4kT}{R} \cdot \Delta f = \frac{4kT}{\varrho_m} \cdot \Delta f \cdot A \quad (Gl. 1.1)$$

Dabei ist Δf die Bandbreite des Verstärkers, ϱ_m der spezifische Membranwiderstand, R der Membranwiderstand, k die Boltzmann-Konstante und A die Membranfläche. Theoretische Betrachtungen zeigen, daß bei der Analyse von Einzelkanälen Ströme der Größenordnung 10^{-12} Ampere gemessen werden müssen (Neher, 1980). Intrazelluläre Ableitungen sind dazu nicht geeignet, weil auch die kleinsten verwendbaren Zellen als Signalquelle mit ihren großen Membranflächen einen zu niedrigen Eingangswiderstand und somit ein zu hohes Eigenrauschen haben.

Diese Schwierigkeiten konnten Neher und Sakmann (1976) mit der Patch-clamp-Technik umgehen, da hierbei im Gegensatz zur Voltage-clamp-Technik nur kleine Membranareale auf Zelloberflächen elektrisch isoliert betrachtet werden. Dazu werden besonders hergestellte Mikropipetten mit ihrer Spitze auf die Zellmembran aufgesetzt (nicht eingestochen!). Die Pipette ist mit physiologischer Salzlösung gefüllt und über eine Elektrode an einen

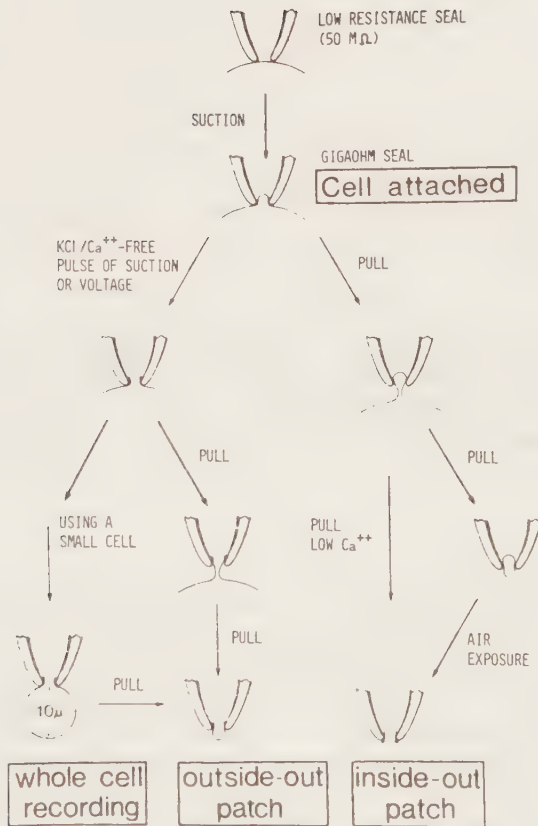


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der verschiedenen Konfigurationen bei der hochauflösenden Giga-seal-Technik. Kontaktieren der Zelle bei anliegendem Unterdruck führt zur Ausbildung eines elektrischen Widerstandes zwischen Zellmembran und Pipette in der Größenordnung von $10^9 \Omega$ (Gigaohm-Seal). Ausgehend von diesem Stadium (cell attached) lassen sich durch Abziehen der Pipette von der Zelloberfläche zwei verschiedene Konfigurationen eines isolierten Membranareals erreichen:

1. Die frühere Außenseite der isolierten Membran zeigt zur Badlösung (outside-out patch).

2. Die frühere Membraninnenseite zeigt zur Badlösung (inside-out patch). Daneben lassen sich mit der Giga-seal-Technik auch Voltage-clamp-Messungen an der ganzen Zelle durchführen, indem man das geklemmte Membranareal zerstört (whole cell recording).

Aus Hamill et al., 1981

möglichst rauscharmen Verstärker angeschlossen. Die Anforderungen an die Stromauflösung, um Signale in der Größenordnung von 10^{-12} A und Lebensdauern von ~ 1 ms messen zu können, lassen sich mit dieser Ableitsituation leicht erfüllen, da nun im wesentlichen nur noch der Abdichtwiderstand zwischen Membran und Glaspipette das Strom-Hintergrundrauschen bestimmt. Unter Einhaltung bestimmter Maßregeln, wie Sauberkeit der Pipettenoberfläche und Anlegen eines Unterdruckes in der Pipette beim Kontaktieren der Zelle, erhält man Widerstände von 10–100 G Ω , sogenannte *giga seals* (Hamill et al., 1981). Bei ihnen ist der Kontakt zwischen Membran und Pipette so stabil, daß man die Pipette ohne weiteres von der Zelloberfläche abziehen kann, ohne daß sich der Sealwiderstand wesentlich ändert. Das verbleibende intakte Membranareal an der Spitze der Pipette kann weiter untersucht werden. Mit Hilfe bestimmter Verfahren erreicht man dabei verschiedene Orientierungen dieses Membranstückes, so daß sowohl die innere als auch die äußere Membranoberfläche der Badlösung zugewandt sein kann. Beide Membranseiten lassen sich somit kontrollierten Bedingungen unterwerfen (Abb. 1.3).

1.1.5 Reaktionskinetik schaltender Ionenkanäle

Im einfachsten Falle ist für den Ionenkanalmechanismus zu fordern, daß ein Kanalprotein einen leitenden und einen nichtleitenden Zustand annehmen soll. Übergänge von dem einen in den anderen Zustand werden in der Terminologie als "Öffnen" und "Schließen" bezeichnet. Dies führt zum Entstehen rechteckförmiger Stromsignale in der Art, wie sie in Abb. 1.4 am Beispiel des Acetylcholinrezeptorkanals und eines Ca^{++} -abhängigen K^{+} -Kanals gezeigt sind. Das Fluktuieren zwischen den Kanalzuständen wird auf molekulare Transformationsvorgänge des Kanalproteins zurückgeführt, wobei (mindestens) eine Konformation des Moleküls die freie Passage von Ionen über die Membran zuläßt (Ehrenstein et al., 1974; Läuger, 1983). Es ist in der Tat heute bekannt, daß ein Proteinmolekül im thermischen Gleichgewicht eine große Anzahl von Konformationszuständen annehmen und sehr schnell von dem einen in den anderen Zustand wechseln kann (Frauenfelder et al., 1979; Karplus, 1982). Fluktuationen von Proteinmolekülen zwischen verschiedenen Konformationen lassen sich durch Röntgenbeugung und Mössbauer-Spektroskopie (Huber et al., 1976; Parak et al., 1981), durch optische Untersuchungen (Lakowicz und Weber, 1980) und durch kinetische Analysen der Ligandenbindung, zum Beispiel an Myoglobin nach Photodissoziation (Austin et al.,

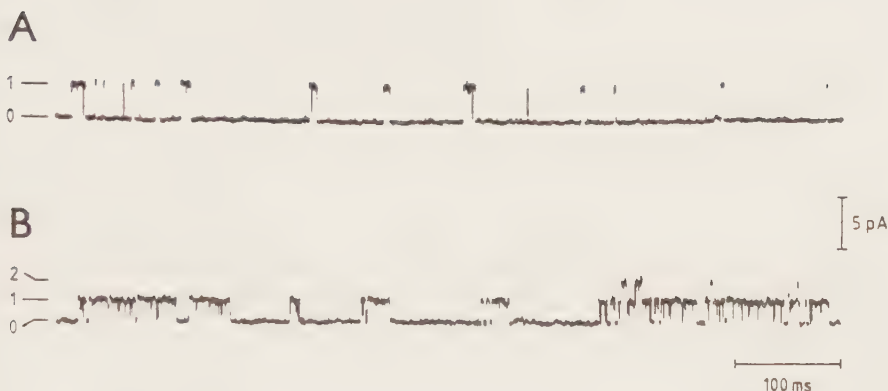
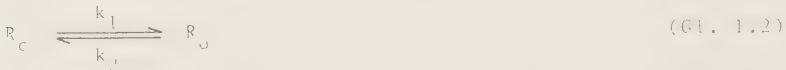


Abb. 1.4: Typische Stromfluktuationen durch einzelne biologische Membrankanäle in zellfreien Patch-clamp-Ableitungen. A: Aufeinanderfolge diskreter Öffnungs- und Schließereignisse durch einen einzelnen nAChR-Kanal in der Zellmembran von Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis*. 0 = geschlossener Kanalzustand; 1 = offener Kanalzustand. In die Zellen wurde spezifische mRNA für alle 4 verschiedenen Untereinheiten (α , β , γ und δ) des nAChR aus Kalbsmuskel injiziert. Während einer Inkubationszeit von 2-4 Tagen wird der funktionsfähige Rezeptorkomplex $\alpha_2\beta\gamma\delta$ in den Oozyten synthetisiert und erscheint in sehr hoher Dichte in der Zellmembran (Sakmann et al., 1985). Hier ist er Patch-clamp-Ableitungen sehr leicht zugänglich. Der Einzelkanalleitwert beträgt 41 pS. Experimentelle Bedingungen: inside-out-patch; Pipettenlösung: 115 mM NaCl; 2.5 mM KCl, 1.7 mM CaCl_2 , 10 mM Hepes, pH 7.2, 1 μM Acetylcholin; Membranspannung: +80 mV, Vorzeichen bezogen auf die Membranaußenseite. Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. C. Methfessel, Göttingen, zur Verfügung gestellt.

B: Stromfluktuationen durch Ca^{++} -abhängige K^{+} -Kanäle in der Membran menschlicher Erythrozyten. Gelegentlich öffnet ein zweiter Ionenkanal (2), der die Öffnungereignisse des ersten Kanals (1) überlagert. Dieser Kanaltyp läßt sich nur beobachten, wenn K^{+} als vorherrschendes stromtragendes Kation vorhanden ist, und wenn die Ca^{++} -Konzentration auf der Membranınnen-seite über die Ruhekonzentration ansteigt (Gardos, 1958; Hamill, 1981; Grygorczyk und Schwarz, 1983). Der Einzelkanalleitwert beträgt 30 pS. Inside-out-patch; Elektrolytlösung: 145 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 5 mM Hepes, pH 7.2; Membranspannung: +70 mV, Vorzeichen bezogen auf die Membranaußenseite.

1975), nachweisen. Diese Messungen zeigen, daß sich Umordnungen innerhalb von Proteinmolekülen im Zeitbereich von Picosekunden bis Sekunden abspielen.

Im einfachsten Fall eines Kanals mit einem offenen Zustand R_o und einem geschlossenen Zustand R_c lassen sich Zustandsänderungen gemäß der chemischen Kinetik als eine monomolekulare Reaktion darstellen:



k_1 und k_2 sind die Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion. Ein solch einfaches Reaktionsschema kann unter gewissen Bedingungen für eine Reihe von Ionenkanälen, wie für den im Rahmen dieser Arbeit behandelten Phalloporinkanal, geltend gemacht werden (Wilmsen, 1983).

Ist die Gesamtkonzentration $[R_g]$ der Kanäle in der Membran konstant, so gilt:

$$[R_g] = [R_o] + [R_c] \quad (\text{Gl. 1.3})$$

$[R_o]$ und $[R_c]$ sind die Konzentrationen der offenen und geschlossenen Kanäle. Für die Änderung der Anzahl offener und geschlossener Kanäle pro Zeiteinheit gilt:

$$\frac{d[R_o]}{dt} = - \frac{d[R_c]}{dt} = k_1 [R_c] - k_2 [R_o] \quad (\text{Gl. 1.4})$$

und mit Gl. 1.3 erhält man:

$$\frac{d[R_o]}{dt} = k_1 [R_c] - (k_1 + k_2) [R_o] \quad (\text{Gl. 1.5})$$

Die Reaktion erreicht im Laufe der Zeit ein Gleichgewicht, in dem sich die Konzentrationen nicht mehr zeitlich ändern. Dann gilt:

$$\frac{d[R_o]}{dt} = 0 \quad \text{und} \quad k_1 [R_c] = k_2 [R_o] \quad (\text{Gl. 1.6})$$

mit der Gleichgewichtskonstanten

$$K = \frac{[R_o]}{[R_c]} = \frac{k_1}{k_2} \quad (\text{Gl. 1.7})$$

Diese Betrachtungen gelten entsprechend der chemischen Kinetik für ein

Vielkanalsystem, ähnlich einer chemischen Reaktion, an der eine große Anzahl von Molekülen teilnimmt. Für ein solches Vielkanalsystem erhält man aus Gl. 1.5 die Zeitkonstante τ der Reaktion:

$$\tau = \frac{1}{k_1 + k_2} \quad (\text{Gl. 1.8})$$

Für die mittleren Verweildauern τ_c und τ_o in den Zuständen R_c und R_o gilt:

$$\tau_o = \frac{1}{k_2} \quad \text{und} \quad \tau_c = \frac{1}{k_1} \quad (\text{Gl. 1.9})$$

Der Nachteil einer Vielkanalanalyse ist, daß die Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 gemäß Gl. 1.8 nicht getrennt voneinander bestimmt werden können und somit auch nicht die mittlere Lebensdauer τ_o und die mittlere Geschlossenzeit τ_c eines Kanals.

Diese Größen lassen sich jedoch getrennt bei Einzelkanalmessungen ermitteln, und zwar durch eine statistische Analyse des Verhaltens individueller Kanäle. Man bedient sich dabei der molekularen Statistik, unter der Voraussetzung, daß für das betrachtete System das statistische Postulat *Zeitmitteilung = Schwaumittelung* gilt (Methfessel und Boheim, 1982).

Bei Einzelkanaluntersuchungen interessiert außerdem die *mittlere Offenwahrscheinlichkeit* p_o des Kanals, die einer direkten Messung zugänglich ist. Für sie gilt im Gleichgewichtsfall (Methfessel und Boheim, 1982):

$$p_o = \frac{K}{K + 1} \quad \text{oder} \quad K = \frac{p_o}{1 - p_o} \quad (\text{Gl. 1.10})$$

Diese Beziehungen für p_o und K sind wichtig, da sie eine Beziehung zwischen dem makroskopischen Vielkanalverhalten und dem mikroskopischen Einzelkanalverhalten herstellen. Beide Größen können unabhängig voneinander in Einzel- und Vielkanalexperimenten ermittelt und miteinander verglichen werden (Kap. 4.6.1).

Die verschiedenen Konformationen, die ein Proteinmolekül annehmen kann, unterscheiden sich durch ihren Energieinhalt. Übergänge zwischen ihnen, bei denen Aktivierungsenergien überwunden werden müssen, kommen durch thermische Schwankungen zustande. Für unseren Kanal mit seinen beiden analysierbaren Zuständen gelten entsprechend die Arrheniusgleichungen (Adam et al., 1977) mit den Aktivierungsenergien E_1 und E_2 :

$$\frac{1}{\tau_c} = k_1 \sim e^{-E_1/RT} \quad (\text{Gl. 1.11})$$

und

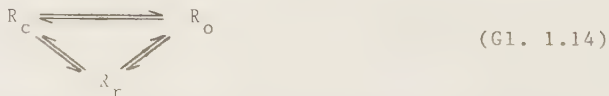
$$\frac{1}{\tau_o} = k_2 \sim e^{-E_2/RT} \quad (\text{Gl. 1.12})$$

Dabei ist R die allgemeine Gaskonstante und T die absolute Temperatur. Für die Gleichgewichtskonstante K gilt die allgemeine thermodynamische Beziehung:

$$K = e^{-\Delta G_o/RT} \quad (\text{Gl. 1.13})$$

wobei ΔG_o die Differenz der freien Enthalpie der beiden Zustände und ΔH_o die entsprechende Reaktionsenthalpie ist. C ist eine temperaturunabhängige Konstante. Die Gl. 1.11 bis 1.13 zeigen, daß die Zustandsverteilung im Gleichgewicht von der Differenz der freien Enthalpien der beiden Zustände abhängt, während die mittleren Lebensdauern der Zustände allein durch die Höhen der Aktivierungsenergien bestimmt werden.

Das Schaltverhalten des in dieser Arbeit behandelten Phalloporinkanals weicht strenggenommen von einem einfachen 2-Zustands-Modell ab, da zusätzlich zu den Zuständen R_o und R_c ein weiterer, inaktiver Zustand R_r angenommen werden kann. Dieser unterscheidet sich vom normalen geschlossenen Zustand R_c durch seine signifikant längere Verweildauer und ist im Einzelkanal-Fluktuationssbild als sogenanntes Interburstintervall, einer langen Pause zwischen zwei aktiven Burstperioden, zu erkennen (Abb. 1.8a). Das vollständige Fluktuationsschema des Phalloporins läßt sich daher in der Form



darstellen, die Geschwindigkeitskonstanten wurden der Einfachheit halber fortgelassen.

Beschränkt man allerdings die kinetische Analyse auf die aktiven Burstperioden, in denen es nur zur Fluktuation zwischen den Zuständen R_c und R_o kommt (Abb. 1.8a), nimmt das Schaltschema des Phalloporins die Form von Gl.

1.2 an. Dieses "eingeschränkte" 3-Zustands-Modell beschreibt den Phalloporinkanal somit formal als einen 2-Zustands-Kanal, für den die in diesem Kapitel dargestellten Gesetzmäßigkeiten geltend gemacht werden können (Methfessel und Boheim, 1982).

1.1.6 Spannungsabhängige und ligandenabhängige Ionenkanäle

Bei den meisten bisher untersuchten biologischen Kanälen wird die Zustandsverteilung zusätzlich von dem in der Membran herrschenden elektrischen Feld bestimmt (Sakmann und Neher, 1983). Kanäle sind dann spannungsabhängig, wenn die freien Enthalpien ihrer Zustände von der Membranspannung beeinflusst werden. Man kann das damit erklären, daß das elektrische Feld auf geladene Gruppen oder Dipolmomente des Proteinmoleküls elektrostatische Kräfte ausübt und dadurch die Gleichgewichtslage zugunsten des einen oder anderen Zustandes verschiebt. Dem trägt man Rechnung, indem man der spannungsunabhängigen freien Enthalpie ΔG_0 einen spannungsabhängigen Term zFV additiv hinzufügt. Die Gleichgewichtskonstante K ist somit eine Funktion der Spannung und für sie gilt dann nach Gl. 1.13:

$$K(V) = \frac{1}{K_0} \exp \left(\frac{-(\Delta G_0 + zFV)}{RT} \right) \quad (\text{Gl. 1.15})$$

Der Term zFV beschreibt den Anteil des elektrischen Feldes an der Energiedifferenz zwischen den beiden Kanalzuständen. Dabei ist F die Faraday-Konstante, V die über der Membran abfallende elektrische Spannung und z eine formale Größe, die angibt, welcher Anteil einer Elementarladung e bei der Öffnungs- und Schließreaktion als formales Äquivalent über die Membran transferiert würde. In der Literatur findet sich für $z \cdot e$ oft auch die Bezeichnung *gating charge* (Schaltladung). Man beachte, daß im Sonderfall $V=0$ die Gl. 1.15 in Gl. 1.13 übergeht.

Die Gl. 1.15 wird anschaulicher, wenn man die konstante Größe ΔG_0 durch ein elektrisches Äquivalent ausdrückt:

$$\Delta G_0 = -zFV_0 = \text{const.} \quad (\text{Gl. 1.16})$$

Gl. 1.15 läßt sich dann schreiben:

$$K = e^{-zF(V - V_0)/RT} \quad (\text{Gl. 1.17})$$

Im Falle $V=V_0$ ist $K=1$, d.h. V_0 ist die Spannung, bei der ein Einzelkanal im Mittel 50 Prozent der Zeit im offenen Zustand verweilt. Man bezeichnet V_0 daher auch als *Mittenspannung*.

Eine Reihe von biologischen Membrankanälen wird in ihrer Aktivität durch spezifische Liganden gesteuert (ligandenabhängige Ionenkanäle). Im allgemeinen nimmt ein solcher Ionenkanal in seiner freien Form einen nichtleitenden Zustand ein, und erst die spezifische Bindung eines oder mehrerer Ligandenmoleküle führt zu einer Kanalöffnung. Als Liganden dienen entweder anorganische Ionen, wie Ca^{++} -Ionen bei Ca^{++} -abhängigen K^+ -Kanälen und H^+ -Ionen beim Phalloporinkanal (Kap. 1.3.3.3), oder höhermolekulare Transmittersubstanzen (Agonisten) wie im Falle des Glycinrezeptors (Betz, 1984) und des nikotinergen Acetylcholinrezeptors (nAChR, s.u.).

Man nimmt an, daß die Bindung solcher Liganden an das Kanalprotein den Übergang in dessen offene, leitende Konformation energetisch begünstigt (Betz, 1985). Die Wahrscheinlichkeit der Bindung, und somit die Offenwahrscheinlichkeit dieser Kanäle, nimmt mit steigender Konzentration des betreffenden Liganden zu. Die Gleichgewichtskonstante K ist daher eine Funktion der Ligandenkonzentration $[\text{Lig}]$. Besitzt ein ligandenabhängiger Ionenkanal n Bindungsstellen, so hängt K von der n -ten Potenz der Ligandenkonzentration ab:

$$K = g([\text{Lig}]) \sim [\text{Lig}]^n \quad (\text{Gl. 1.18})$$

Allgemein läßt sich n als Geradensteigung in einer doppeltlogarithmischen Darstellung von K gegen $[\text{Lig}]$ ermitteln.

In vielen Fällen sind ligandenabhängige Ionenkanäle gleichzeitig spannungsabhängig. Sind Spannungs- und Ligandenabhängigkeit unabhängig voneinander, so gilt für die Gleichgewichtskonstante (Methfessel, 1983):

$$K = g([\text{Lig}]) \cdot f(V) \quad (\text{Gl. 1.19})$$

1.1.7 Der Acetylcholinrezeptorkanal als Beispiel eines biologischen Membrankanals

Viele biologische Membranen können durch spezifische chemische Transmittersubstanzen erregt werden. Dieses Prinzip kommt beispielsweise in Nerven- und Muskelzellen zur Geltung, wenn elektrische Signale über einen synaptischen Spalt von einer präsynaptischen auf eine postsynaptische Nervenzelle oder auf eine Muskelzellmembran übertragen werden müssen. Das Eintreffen einer elektrischen Erregung am Ende der präsynaptischen Nervenzelle bewirkt hier die Freisetzung einer Transmittersubstanz, die in dem synaptischen Spalt von etwa 50 nm schnell zur postsynaptischen Membran diffundiert und an dieser eine Veränderung der Membranleitfähigkeit hervorruft. Dieser chemische Reiz wird von hochspezifischen Proteinrezeptoren erfaßt, verarbeitet und in eine Permeabilitätsänderung der postsynaptischen Membran umgesetzt (Katz, 1966). Solche Rezeptormoleküle haben eine transmittergesteuerte Ionenkanalfunktion, sind integraler Bestandteil der erregbaren postsynaptischen Membran und kommen hier meist in sehr hoher Dichte vor.

Der zur Zeit wohl am besten bekannte Rezeptor – sowohl in elektrophysiologischer als auch biochemischer Hinsicht – ist der nikotinerge Acetylcholinrezeptor (nAChR), der in der neuromuskulären Endplatte das entscheidende Glied in der Übertragungskette elektrischer Aktionspotentiale von der Nervenzelle auf den Muskel darstellt (Hucho, 1986). Eine Reihe von biochemischen und elektrophysiologischen Untersuchungen haben zur Erstellung eines aktuellen Strukturmodells beigetragen, das deshalb an dieser Stelle als beispielhaft für biologische Membrankanäle kurz umrissen werden soll.

Als ein in der postsynaptischen Membran verankerter, transmittergesteuerter Ionenkanal setzt der nAChR das chemische Signal "Acetylcholin" in eine Depolarisation der postsynaptischen Membran um. Diese kommt durch eine Erhöhung der Permeabilität für Kationen zustande. Der Rezeptor hat also zwei wichtige Aufgaben zu erfüllen: a) die Signalerkennung (Bindung von Acetylcholin) und b) die Signalumsetzung (Öffnung des Ionenkanals).

Relativ gut bekannt sind heute die Quartär- und die Primärstruktur, die sekundäre und die tertiäre Struktur sind dagegen noch ziemlich spekulativ. Das ist nicht verwunderlich, da sich die Anordnung der Rezeptoruntereinheiten in der Membran zwar mit Hilfe der hochauflösenden Elektronen-

mikroskopie mittlerweile gut darstellen läßt (Popot und Changeux, 1984), eine dreidimensionale Darstellung des gesamten Rezeptorkomplexes mit den sehr viel höher auflösenden Methoden der Röntgenkristallographie aber noch aussteht. Die maximal erreichbare Auflösung mit nichtkristallographischen Methoden liegt gegenwärtig bei etwa 3 nm.

Mit Hilfe der sich rasch entwickelnden rekombinanten DNA-Technik gelang vor kurzem die vollständige Aufklärung der Aminosäuresequenzen aller Untereinheiten des nAChR aus dem elektrischen Organ von *Torpedo californica* (Noda et al., 1982, 1983 a,b; Claudio et al., 1983).

Der nAChR ist ein pentameres Protein, bestehend aus fünf Polypeptidketten, von denen zwei identisch sind (Hucho und Changeux, 1973; Hucho et al., 1978). Die Untereinheitenstruktur des Rezeptorkomplexes ist $\alpha_2, \beta, \gamma, \delta$ (Reynolds und Karlin, 1978). Die aufgrund der Aminosäuresequenzen bestimmten relativen Molmassen der einzelnen Untereinheiten betragen 50200 (α), 53700 (β), 56300 (γ) und 57600 (δ), mit einer Gesamtmolmasse von 268000 (Noda et al., 1982, 1983 a,b). Jede α -Untereinheit besitzt je eine Bindungsstelle für Acetylcholin, so daß maximal 2 Agonistenmoleküle gleichzeitig am Rezeptor gebunden sein können (Maelicke, 1984).

Diese fünf Untereinheiten durchragen die Membran als echte integrale Proteine und sind in einer ringförmigen Struktur wie die Dauben eines Fasses angeordnet (Abb. 1.5a). Der extrazelluläre und der zytoplasmatische Teil des zylindrischen Rezeptormoleküls, die aus der Membranfläche herausragen, sind asymmetrisch, während der membranüberspannende Teil aller Helices, der etwa 35 Prozent der Gesamtlänge des Moleküls ausmacht, hochsymmetrisch ist (Schmidt und Raftery, 1974; Kistler et al., 1982; Zingsheim et al., 1982). Der äußere Durchmesser dieser ringförmigen Kanalstruktur beträgt 6.5 nm, ihre Länge 14.0 nm (Brisson und Unwin, 1984). In der Aufsicht zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen ein zentrales Loch, das als der Eingang des eigentlichen Ionenkanals gedeutet wird (Finer-Moore und Stroud, 1984).

Da eine Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse des Rezeptorproteins bisher nicht gelang, liegt die tertiäre dreidimensionale Struktur der Untereinheiten noch ziemlich im dunkeln. Eine wertvolle Hilfe ist aber die vollständige Bestimmung der Aminosäuresequenzen aller fünf Untereinheiten, die eine vorsichtige Voraussage der möglichen Proteinfaltungen erlaubt. Die Verteilung der Aminosäuren in der Primärstruktur zeigt, daß die hydrophoben Anteile in den Untereinheiten ungleich verteilt sind, so daß in den Polypeptidketten mehrere, stark hydrophobe Bereiche erscheinen, die essentiell

für die Einlagerung in den Lipidbilayer der Membran sein sollen (Noda et al., 1982, 1983 a,b; Claudio et al., 1983; Devillier-Thiery et al., 1983). Man nimmt heute die Existenz von fünf solcher hydrophober Domänen in jeder Untereinheit an, die die membranüberspannenden Teile bilden, wobei sie - in Analogie zum Bakteriorhodopsin (Henderson und Unwin, 1975) - eine α -helikale Struktur einnehmen. Diese mutmaßlich membranüberspannenden Helices werden in der Literatur mit MI, MII, MIII, MIV und MA gekennzeichnet. Den Modellvorstellungen zufolge soll jeweils eine dieser membranüberspannenden Helices in diesen Untereinheiten zu der Auskleidung des Ionenkanals beitragen (Finer-Moore und Stroud, 1984; Hucho, 1986; Imoto et al., 1986; Abb. 1.5b).

Zunächst ziemlich unabhängig von der biochemischen Untersuchung nahm die elektrophysiologische Charakterisierung des nAChR, vor allem seit der Mitte der siebziger Jahre mit der Entwicklung der Patch-clamp-Technik, einen raschen Aufstieg (Neher und Sakmann, 1976). Daher seien die wichtigsten Eigenschaften dieses Kanals erwähnt, die aufgrund elektrophysiologischer Messungen bestimmt wurden.

a) Der Ionenkanal ist selektiv für Kationen, impermeabel für Anionen (Popot et al., 1976). Zwischen monovalenten Kationen unterscheidet er nicht so stark, wobei die Permeabilität für Cs^+ -Ionen am höchsten, für Li^+ -Ionen am niedrigsten ist. Für zweiwertige Kationen ist der Kanal nur im geringen Maße permeabel (Adams et al., 1980).

b) Der Kanal öffnet und schließt nach dem Alles-oder-nichts-Prinzip mit dem charakteristischen Auftreten rechteckförmiger Strompulse (s. Abb. 1.4).

c) Der Ionenkanal ist eine wassergefüllte Pore, wobei die durchtretenden Ionen ausschließlich mit Wassermolekülen und praktisch nicht mit Seitenketten von Aminosäuren wechselwirken (Lewis und Stevens, 1983).

Was die weitere Charakterisierung des nAChR betrifft, erscheint die in den letzten Jahren immer intensiver werdende Kooperation mehrerer Disziplinen - Elektrophysiologie und Biochemie sowie Genetik bzw. Molekularbiologie - sehr vielversprechend. Rekombinante DNA-Technik und Patch-clamp-Technik zusammen ermöglichten in jüngster Zeit eindeutige Zuordnungen von biochemischen und elektrophysiologischen Merkmalen des nAChR-Proteins (Sakmann et al., 1985; Imoto et al., 1986).

Sind auch viele Einzelheiten des nAChR wie Aminosäuresequenzen und Anordnungen der Untereinheiten geklärt, so müssen wesentliche Fragen noch gelöst werden: Wie bewirkt die Bindung von Acetylcholin die Öffnung des Kanals?

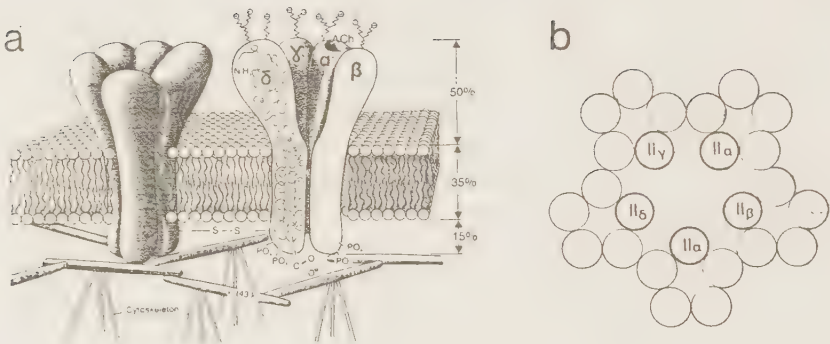


Abb. 1.5a: Modell des nAChR aus *Torpedo californica* nach den bisher vorliegenden biochemischen Daten. Die fünf ringförmig angeordneten Untereinheiten durchdragen den Lipidbilayer und tragen auf der Außenseite Oligosaccharidketten. Auf der cytoplasmatischen Seite ist der Rezeptor über ein 43-kD-Protein mit dem Cytoskelett verbunden.

Abb. 1.5b: Querschnitt durch den Rezeptor (Aufsicht). Jede Untereinheit besitzt fünf mutmaßlich membrangängige α -Helices, von denen jeweils eine an der Auskleidung des Kanallumens beteiligt ist. Neuere Untersuchungen (Hucho, 1986; Imoto et al., 1986) deuten darauf hin, daß die membrangängige Helix M II an der Kanalauskleidung beteiligt ist.

Aus Hucho, 1986, leicht verändert

Welche Strukturen bestimmen die Selektivität? Außerdem steht eine Kristallisation aus, die die Voraussetzung für eine genaue räumliche Darstellung des nAChR ist. Nur die Kooperation verschiedener Disziplinen scheint eine Lösung dieser Fragen in absehbarer Zeit zu ermöglichen, um damit zum Verständnis der Funktionsmechanismen nicht nur des nAChR, sondern biologischer Kanäle allgemein beizutragen.

Zweck dieses Abschnittes sollte sein, den aktuellen Wissensstand über die Struktur von Kanalproteinen im Zusammenhang mit ihrer Struktur aufzuzeigen. Seit es zum ersten Mal in einer sehr eleganten Weise gelang, die räumliche Struktur eines integralen Membranproteins aufzuklären (Henderson und Unwin, 1975), zeichnet sich in den letzten Jahren immer deutlicher die essentielle Bedeutung von α -helikalen Proteinstrukturen für die Funktion biologischer Membrankanäle ab. So ist es sicherlich kein Zufall, daß für den Na^+ -Kanal, der wie der nAChR-Kanal ubiquitär ist und eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen spielt, in analoger Weise eine durch α -Helices aufgebaute Struktur favorisiert wird (Noda et al., 1984; Guy et al., 1986).

1.2 Modellsysteme

1.2.1 Künstliche planare Lipidmembranen

Es wurde bereits dargestellt, daß herkömmliche elektrophysiologische Meßmethoden zur Registrierung von Einzelkanalströmen im pA-Bereich bei Ableitung von ganzen Zellen wegen ihres geringen Auflösungsvermögens versagen. Noch vor Entwicklung der Patch-clamp-Technik konnte man diese Schwierigkeit umgehen, indem man einzelne, isolierte Transportsysteme in künstliche planare, bimolekulare Lipidmembranen inkorporierte und ihr Verhalten untersuchte. Auf diese Weise gelang es Bean et al. (1969) erstmals zu zeigen, daß mikroskopische Ströme über Lipidmembranen, wie von Hodgkin und Huxley (1952) gefordert, gequantelt sind und auf Öffnungs- und Schließereignissen diskreter, leitender Strukturen beruhen.

Die üblichen Herstellungsmethoden künstlicher Lipidbilayer werden in Kap. 2.2 ausführlich beschrieben. Diese Modellmembranen sind in ihrer Struktur biologischen Membranen sehr ähnlich und bieten zudem viel überschaubarere Eigenschaften. Auch neben der Patch-clamp-Technik sind sie als alternative Methode heute nicht wegzudenken, da mit ihnen ein viel breiteres Spektrum

von Parametern variiert und analysiert werden kann. So ist es möglich, die chemische Zusammensetzung künstlicher Lipidmembranen in weiten Bereichen zu variieren, angefangen von reinen Einkomponentensystemen bis zu verschiedenen Mischungen von Phospholipiden. Man hat also mit künstlichen Lipidmembranen eine ideale Methode zur Hand, um Wechselwirkungen zwischen Kanalproteinen und ihrer Lipidumgebung zu untersuchen. Zudem bieten künstliche Lipidmembranen den Vorteil, daß Kanalproteine untersucht werden können, die der Patch-clamp-Technik aus präparativen Gründen nur schlecht oder überhaupt nicht zugänglich sind (Hanke und Kaupp, 1984).

Eine Ergänzung zu den herkömmlichen Methoden der Bilayerherstellung (Kap. 2.2) bieten Techniken, mit denen künstliche Lipidmembranen auf der Spitze von Patch-clamp-Pipetten hergestellt werden können (Tank et al., 1982; Wilmsen et al., 1983; Coronado und Latorre, 1983; Montal et al., 1983; Schindler und Schuerholz, 1983; Hanke et al., 1984). Hier lassen sich die Vorzüge der künstlichen Lipidmembranen mit der durch die Patch-clamp-Technik erzielten hohen elektrischen Auflösung verbinden.

1.2.2 Einbau von Transportsystemen in künstliche Lipidmembranen

Hinsichtlich der Art und Funktionsweise verschiedenartiger Membrantransportsysteme sind ihrer Untersuchung in künstlichen Lipidmembranen kaum Grenzen gesetzt. Sowohl bewegliche Carriermoleküle (Shemyakin et al., 1969; Läger, 1972) als auch transmembranäre Membrankanäle lassen sich in künstliche Membranen inkorporieren und untersuchen. Nur im Hinblick auf ihre Wasser- bzw. Lipidlöslichkeit muß man in Bezug auf die zu wählende Inkorporationsmethode eine Klassifizierung vornehmen. So unterscheidet man zwischen wasserlöslichen Kanalbildnern und wasserunlöslichen intrinsischen Kanalproteinen.

1.2.2.1 Einbau von wasserlöslichen Kanalbildnern

Seitdem künstliche Lipidmembranen zur Untersuchung von Transportphänomenen verwendet werden (Mueller et al., 1962), ist eine Vielzahl von wasserlöslichen Substanzen beschrieben worden, die die Leitfähigkeit reiner Lipidbilayer erhöhen können. Viele von ihnen werden von Bakterien oder Pilzen als antibiotisch wirkende Toxine produziert und an das Außenmedium abgegeben (Hoch et al., 1985). Andere Substanzen erfüllen im produzierenden

Organismus ursprünglich ganz andere Aufgaben als die eines Kanalbildners, wie etwa das sauerstofftransportierende Hämocyanin (Pant und Conran, 1972; Latorre et al., 1975; Menestrina und Antolini, 1979). Der sicherlich bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist das aus Kulturen von *Bacillus brevis* isolierte Pentadecapeptid Gramicidin A, das in Membranen durch einen Dimerisationsprozeß kationenspezifische Poren bildet (Hladky und Haydon, 1970; Urry, 1971; Haydon und Hladky, 1972; Bamberg und Läuger, 1974). Viele dieser wasserlöslichen Kanalbildner üben eine cytolytische Wirkung auf andere Zellen aus. Da es sich bei den im Rahmen dieser Arbeit erwähnten Pilztoxinen Phallolysin und Rubescenslysin ebenfalls um Cytolysine handelt, wurde dieser Klasse von wasserlöslichen Proteinen ein eigenes Kapitel gewidmet (Kap. 1.3).

1.2.2.2 Rekonstitution biologischer Membrankanäle

Eine Hauptschwierigkeit bei dem Einbau (Rekonstitution) integraler Membrankanäle, z.B. des Acetylcholinrezeptorkanals und des Ca^{++} -abhängigen K^{+} -Kanals, in planare Lipidmembranen ist, daß es sich um extrem wasserunlösliche Proteine handelt. Kanalproteine lassen sich nur mit Hilfe bestimmter Detergenzien schonend aus ihrer Lipidumgebung isolieren, aufreinigen und schließlich in einem Dialysevorgang in Gegenwart von im Überschuß vorhandenen Phospholipiden wieder von den Detergenzien trennen. In einem wäßrigen Medium entstehen auf diese Weise Liposomen, die in ihrer Bilayerphase das isolierte Kanalprotein enthalten. Um diese in planare künstliche Lipidbilayer zu rekonstituieren, macht man sich die Eigenschaft bimolekularer Lipidsysteme zunutze, miteinander unter bestimmten Bedingungen zu fusionieren. Spontane Fusion von Vesikeln mit planaren Lipidmembranen kann zum einen erfolgen, wenn der Bilayer negativ geladene Phospholipide enthält und Ca^{++} in millimolaren Konzentrationen in der wäßrigen Phase vorhanden ist (Miller et al., 1976; Miller und Racker, 1976). Die Fusionsraten sind außerdem von einem über der Membran anliegenden osmotischen Gradienten abhängig.

Zum anderen fusionieren Phospholipidvesikel bei Temperaturen unterhalb der Phasenumwandlungstemperatur T_c des reinen Lipids mit planaren Lipidmembranen (Hanke et al., 1981).

In den letzten Jahren konnte eine Reihe von biologischen Membrankanälen über die Fusionstechnik in planaren Lipidbilayern rekonstituiert werden. Am

interessantesten sind dabei die Beispiele der Rekonstitution von Membrankanälen, die parallel dazu mit der Patch-clamp-Technik untersucht wurden, wie etwa der nAChR-Kanal aus *Torpedo marmorata* (Boheim et al., 1981), von Ca^{++} -aktivierten K^{+} -Kanälen (Latorre et al., 1982) und von Na^{+} -Kanälen (Krueger et al., 1983). In diesen Fällen zeigt sich eine große qualitative Übereinstimmung der gefundenen Einzelkanaldaten bei beiden Meßmethoden.

1.3 Wasserlösliche cytolytische Toxine

Heute ist eine große Anzahl von wasserlöslichen Proteinen bekannt, die die Lipidbilayerstruktur von Zellmembranen angreifen und somit eine meist letale Schädigung der Zelle hervorrufen. Hinsichtlich der Wirkungsweisen kann man solche Cytolysine in drei Klassen einordnen (Bhakdi und Tranum-Jensen, 1983):

1.) Der erste Mechanismus umfaßt einen direkten enzymatischen Angriff auf Membranlipide. Zu dieser Klasse zählen die gut charakterisierten bakteriellen und Schlangengift-Phospholipasen (Habermann, 1960; Aloof-Hirsch et al., 1968; Condrea et al., 1970; Colley et al., 1973; Verkleij et al., 1973).

2.) Die zweite Klasse von Cytolysinen umfaßt die Proteine, die durch ihre Einlagerung in den Lipidbilayer diskrete transmembranäre Ionenkanäle bilden. Das erste Proteinsystem, für das eine solche Wirkungsweise vorgeschlagen wurde, ist das cytolytisch wirkende Komplementsystem C5b-9(m) der Immunabwehr (Mayer, 1972; Menestrina und Pasquali, 1985).

3.) Der dritte Mechanismus ist eine detergensartige, nichtenzymatische Wirkung von Cytolysinen auf den Bilayer, wie sie etwa durch das bekannte Bienengift Melittin (Habermann, 1968), das von dem Fadenpilz *Trichoderma viride* produzierte Polypeptid Alamethicin (Jung et al., 1981) oder das Fischgift Pardaxin (Pal et al., 1981) ausgeübt werden.

Die letzten beiden Mechanismen beruhen auf physikalischen Störungen der Lipidbilayerstruktur und sind durch elektrochemische Messungen an künstlichen Lipidmembranen analysierbar. Nicht zuletzt dank solcher Bilayeruntersuchungen konnte in den letzten Jahren für eine Vielzahl weiterer wasserlöslicher Cytolysine ein Kanalbildungsmechanismus nachgewiesen werden. Zu den wichtigsten zählen das α -Toxin aus *Staphylococcus aureus* (Bernheimer, 1974; Menestrina, 1986) und die kanalbildenden cytolytischen Colicine aus *Escherichia coli* (Schein et al., 1978), deren chemische Struktur und Kanalbildungsverhalten mittlerweile gut aufgeklärt sind.

Überraschenderweise lassen sich bei Untersuchungen an künstlichen Lipidmembranen auch für manche detergensartig wirkende Cytolysine diskrete Leitfähigkeitsänderungen der Membran aufzeigen, so etwa beim Alamethicin und seinen Strukturanaloga (Gordon und Haydon, 1972; Eisenberg et al., 1973; Boheim, 1974) und dem Seeanemonen-Toxin aus *Stoichactis helianthus* (Michaels, 1979; Shin, 1979).

Vor allem in ihrem strukturellen Aufbau weisen einige Cytolysine starke Analogien zu biologischen Membrankanälen wie dem nAChR und dem Na^+ -Kanal auf. Die Idee liegt daher nicht fern, sie wegen ihrer leichteren Handhabbarkeit als Modellsysteme zu betrachten, um einen tieferen Einblick in die Steuerungsmechanismen biologischer Kanäle zu bekommen.

1.3.1 Kanalbildende Colicine

Colicine sind Proteine mit nativen molekularen Massen zwischen 60-80 kD, die sensitive E.-coli-Zellen nach Bindung an einen spezifischen Rezeptor und Translokation in die innere Zellmembran abtöten (Cramer et al., 1983). Die genauen Aminosäuresequenzen der Colicine A und E wurden durch Bestimmung der Nukleotidsequenzen der kodierenden Gene bzw. durch automatische Aminosäuresequenzierung bestimmt (Yamada et al., 1982; Morlon et al., 1983 a,b).

Die kanalbildenden Eigenschaften der Colicine A, E1 und Ia konnten erstmals durch Schein et al. (1978) mit Messungen an planaren Lipidmembranen nachgewiesen werden. Physiologische und biochemische Untersuchungen an Zellen hatten bereits vorher ergeben, daß die Bindung *eines einzigen* Colicinmoleküls an eine Zelle ausreicht, um diese zu lysieren. Diese Eigenschaft von Colicinen wird als *single-hit-killing* bezeichnet. Man vermutete, daß die letale Wirkung auf einem Abbau des elektrochemischen Potentials über der Zellmembran beruht (Fields und Luria, 1969; Gould und Cramer, 1977; Tokuda und Konisky, 1978; Weis und Luria, 1978). Dieser Single-hit-killing-Mechanismus konnte durch die Einzelkanalmessungen der Colicine durch Schein et al. (1978) elegant nachgewiesen werden. Aufgrund der Einzelkanalleitwerte $\sim 3 \cdot 10^6$ Ionen/s in 0.1-M-Elektrolytlösung – konnte man berechnen, daß ein einziger Colicinkanal genügt, um das elektrochemische Potential über der Zellmembran vollständig zusammenbrechen zu lassen (Cramer et al., 1983).

Die Abb. 1.6 zeigt Einzelkanalfluktuationen des C-terminalen Endes von Colicin A, das allein die kanalbildenden Eigenschaften umfaßt (Dankert et

al., 1982; Ohno-Ywashita und Imahori, 1982; Cleveland et al., 1983; Bullock et al., 1983; Martinez et al., 1983; Davidson et al., 1984 a). Man erkennt deutlich den kontinuierlich fortschreitenden Einbau von Colicin-A-Fragment-Kanälen. Dabei ist die einheitliche Amplitude aller diskreten Stufen zu beachten. Im Gegensatz zum Alamethicin (s.u.) bilden die Colicine invariabel strukturierte Membrankanäle. Der hohe α -helikale Anteil des C-terminalen Fragments deutet auf eine Kanalstruktur hin, die durch eine ringförmige Anordnung membrangängiger α -Helices zustande kommt. Diese Helices sollen amphipatisch sein, wobei eine hydrophile Seite zum wäßrigen Kanallumen gerichtet ist, während die andere, hydrophobe Seite mit der Kohlenwasserstoffmatrix des Bilayers in Kontakt steht.

Gegenwärtige Strukturmodelle propagieren 5-8 solcher membrangängigen α -Helices pro C-terminalem Fragment, wobei aber noch strittig ist, ob ein Colicin-A-Molekül für die Kanalbildung genügt (Davidson et al., 1984 a) oder ob 2 bis 3 Moleküle mit jeweils 3 oder 2 ihrer α -Helices zum Kanalaufbau beitragen (Trimer- und Dimermodelle, Pattus et al., 1985). Es sei betont, daß gerade die letzteren Modelle stark an das für den nAChR vorgeschlagene Strukturmodell mit 5 Untereinheiten erinnern (Abb. 1.5b). Dies zeigt, daß die kanalbildenden Cytolysine ihrer Rolle als biochemisch und genetisch leicht handhabbare Modellsysteme gerecht werden können.

1.3.2 Das Alamethicin

Alamethicin und seine Strukturanaloga Suzukacillin und Trichotoxin A-40 sind antibiotisch wirksame Polypeptide, die von verschiedenen Stämmen des Fadenpilzes *Trichoderma viride* produziert werden (Meyer und Reusser, 1967). Wegen seiner gut untersuchten Struktur-Funktions-Beziehungen kann Alamethicin heute sowohl in biochemischer als auch elektrochemischer Hinsicht neben dem Gramicidin als der am besten charakterisierte Kanalbildner gelten. Alamethicin besteht aus 19 L-Aminosäuren mit einem hohen Anteil hydrophober Reste und einem Aminoalkohol. Gelang es zunächst, die starke leitfähigkeitserhöhende Wirkung auf planare Lipidmembranen zu zeigen (Mueller und Rudin, 1968), so konnte kurze Zeit darauf die Bildung diskreter, ionenleitender Kanäle durch Alamethicin nachgewiesen und analysiert werden (Gordon und Haydon, 1972; Eisenberg et al., 1973; Boheim, 1974). Die Abb. 1.7a zeigt das unverkennbare Erscheinungsbild von alamethicinartigen Kanälen: Charakteristisch ist zum einen das Auftreten von Ereignisgruppen

(Bursts), zum anderen wird innerhalb einer solchen Sequenz nicht ein einzelner Leitwert angenommen, sondern es kommt zu Fluktuationen zwischen mehreren Leitwertstufen. Die einzelnen Leitwerte sind dabei nicht einfache ganzzahlige Vielfache voneinander. Eine Pore öffnet häufig mit dem Durchlaufen des niedrigsten Leitwertniveaus und schließt aus diesem auch wieder.

Das umfassendste Kanalmodell ist das von Boheim et al. (1983) vorgeschlagene, mit dem Flipflopmechanismus einzelner α -Helices erweiterte, *Barrel-stave-Modell*. Dieses wird allen bisher gefundenen Charakteristika des Alamethicins, wie der Spannungsabhängigkeit und dem Auftreten nicht ganzzahliger Leitwertstufen, gerecht. Das Flipflopmodell ist in Abb. 1.7b dargestellt. Besondere Berücksichtigung finden hier die Dipoleigenschaften des α -helikalen Alamethicinmoleküls (Hol et al., 1981; Yantorno et al., 1982; Schwarz und Savko, 1982). Nach diesem Modell entstehen die verschiedenen Leitwertzustände durch eine unterschiedliche Anzahl α -helikaler "Stäbchen", die in der Membranfläche ringförmig wie die Dauben eines Fasses angeordnet sind und den jeweiligen Porenzustand bilden. Die unterschiedlichen Leitwerte kommen durch den sich laufend verändernden Durchmesser des wassergefüllten Kanallumens zustande.

Das ebenfalls detergensartig wirkende Melittin, das aus 26 Aminosäuren besteht, bildet typischerweise Kanäle mit einem ähnlichen Muster von nicht ganzzahligen Leitwertsequenzen (Hanke et al., 1983).

Ein Wesensmerkmal der mit dem Alamethicin strukturell verwandten Cytolysine ist also, daß sie ionenleitende Kanäle mit laufend variierenden Querschnittsflächen bilden können. Damit unterscheiden sie sich grundsätzlich von den meist einheitlich strukturierten biologischen Kanälen, die eine fixierte Größe besitzen. Dies kommt in den unterschiedlichen Fluktuationsmustern der Einzelkanäle zum Ausdruck, wie ein Vergleich mit dem nAChR-Kanal (Abb. 1.4) und dem Colicin-A-Fragment (Abb. 1.6) zeigt. Kennzeichnend für Membrankanäle mit einer fixierten Größe ist, daß meist nur eine, genau definierte Leitwertstufe angenommen wird.



Abb. 1.6: Der schrittweise Anstieg der Membranleitfähigkeit eines planaren Lipidbilayers nach Zugabe des C-terminalen Fragments von Colicin A auf einer Seite. Angelegte Membranspannung: +80 mV. Die einzelnen Stromschritte markieren die Einbau- bzw. Öffnungs- und Schließereignisse einzelner Kanäle. Der Einzelkanalleitwert ist einheitlich und beträgt 13 ± 1 pS. Aus Martinez et al., 1983

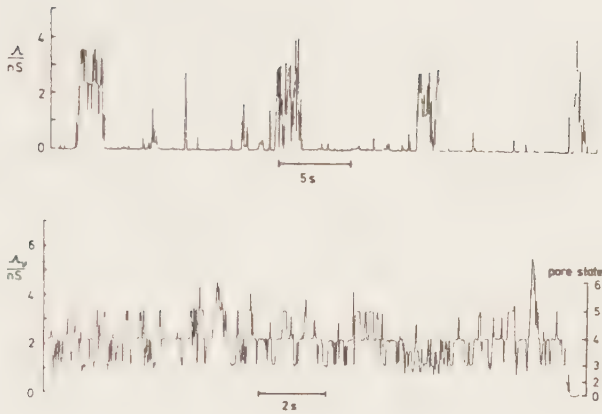


Abb. 1.7a: Stromfluktuationen in einer mit Alamethicin dotierten Lipidmembran aus 1 % Dioleoyllecithin in n-Dekan. Obere Spuren: Folge einzelner Gruppen von Öffnungsereignissen. Untere Spuren: Niveaufluktuationen innerhalb einer Ereignisgruppe bei höherer Zeitdehnung.

Aus Kolb und Boheim, 1978



Abb. 1.7b: Das "Flipflop-gating-Modell" des Alamethicinkanals bei Aufsicht auf die Membranfläche. Alamethicinmoleküle sind in dem Bilayer senkrecht zur Membranebene eingelagert und zunächst wegen der einseitigen Kompartimentzugabe einheitlich so orientiert, daß der negative Pol des α -helikalen Dipols zur Zugabeseite (cis-Seite) zeigt ($\ominus$). Treffen solche parallel-orientierten Dipole bei ihrer lateralen Diffusion in der Membran aufeinander, stoßen sie sich elektrostatisch ab - es liegen nur Monomere vor (a). Einzelne Dipole können sich spontan in der Membran umorientieren (Flip), so daß sie in eine antiparallele Lage zu den anderen geraten ($\oplus$) und nun mit ihnen zu Trimeren (b), Hexameren (c) oder höheren Oligomeren (d) lateral aggregieren können. Das Anlegen einer positiven Membranspannung ist energetisch ungünstig für die $\oplus$ -Dipole, die nun antiparallel zum elektrischen Feld in der Membran liegen. Sie orientieren sich in die ursprüngliche Lage zurück (Flop) und werden wieder zu $\ominus$ -Dipolen. Im Aggregat stoßen sich die Monomere elektrostatisch ab und bilden einen zentralen, wassergefüllten Kanal. Die dielektrische Abschirmung durch Wasser und Ionen stabilisiert diese Ringanordnung, da die hohe Dielektrizitätskonstante des Wassers die elektrostatische Abstoßungskraft der parallelen $\ominus$ -Dipole um mindestens eine Größenordnung herabsetzt.

Aus Boheim et al., 1983

1.3.3 Cytolytische und kanalbildende Proteine in Pilzen der Gattung Amanita

Toxine mit cytolytischen Eigenschaften werden von einer großen Anzahl von Pilzen produziert. Vor allem innerhalb der Gattung Amanita wurde das Vorkommen von Hämolsinen – Stoffen mit der Fähigkeit, Erythrozyten zu lysieren – eingehend untersucht (Seeger et al., 1973; Seeger, 1980 b). Einige dieser Toxine wurden in den letzten Jahren isoliert und biochemisch charakterisiert (Seeger, 1980 b).

Phallolysin aus dem grünen Knollenblätterpilz Amanita phalloides (Vaill. ex Fr.) Secr. und Rubescenslysin aus dem Roten Perlpilz Amanita rubescens (Pers. ex Fr.) Gray sind zwei cytolytisch wirkende, hochmolekulare Proteine, die mittlerweile aufgereinigt und im Detail untersucht werden konnten (Seeger und Lehmann, 1973; Faulstich und Weckauf-Bloching, 1974; Seeger, 1976). Beiden Toxinen ist eine starke hämolytische Wirkung eigen, sie vermögen aber auch eine große Anzahl anderer Säugetierzellen zu lysieren (Seeger und Lehmann, 1973; Faulstich et al., 1974; Odenthal et al., 1976).

1.3.3.1 Phallolysin

Phallolysin ist ein wasserlösliches, thermo- und säurelabiles Protein, seine mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmte relative Molmasse wird mit 34000 angegeben (Faulstich et al., 1983). Seine lysierende Wirkung beruht auf einem direkten Angriff auf die Zellmembran. Es zeigt dabei eine bemerkenswerte Artspezifität: Menschliche und Rattenerythrozyten erweisen sich als sehr empfindlich gegen Phallolysin, während Rinder- und Schaferythrozyten sehr resistent sind (Seeger und Burkhardt, 1976; Faulstich et al., 1983). Da man zeigen konnte, daß die durch Phallolysin induzierte Hämolyse auf einer Erhöhung der Kationenpermeabilität der Zellmembran, vor allem für Na^+ - und K^+ -Ionen, beruht (Seitz et al., 1981; Bühring et al., 1983), vermutete man, daß die cytolytische Wirkung durch die Bildung kationenpermeabler Kanäle in den Lipidbilayerbereichen der Zellmembranen zustande kommt (Seitz et al., 1981; Bühring et al., 1983; Faulstich et al., 1983).

1.3.3.2 Rubescenslysin

Rubescenslysin ist ein wasserlösliches, thermo- und alkalilabiles Protein. In wäßrigen Lösungen neigt es bei physiologischen pH-Werten zu der Bildung molekularer Aggregate variabler Größe; die mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese unter desaggregierenden Bedingungen bestimmte relative Molmasse des Monomers beträgt 35000 (Seeger, 1980 b). Gegenüber dem Phallolysin zeichnet es sich durch seine ausgeprägte Oberflächenaktivität aus.

Da Rubescenslysin und Phallolysin als wasserlösliche Cytolysine von Pilzen derselben Gattung produziert werden und annähernd gleiche Molmassen haben, war es überraschend, daß sich beide in ihrer Wirkung auf tierische Zellen deutlich unterscheiden. Rubescenslysin übt eine mehr detergensartige Wirkung auf Zellmembranen aus. Dafür spricht die fortschreitende Reduzierung der lytischen Aktivität von Rubescenslysin während der Hämolyse und der Aktivitätsverlust in Gegenwart von Phospholipidvesikeln. Es ist wie erwähnt oberflächenaktiv und vermag als Protein verglichen mit dem Albumin Phospholipide stärker zu adsorbieren (Seeger, 1980 a). Außerdem zeigt Rubescenslysin, anders als das Phallolysin, in seiner Wirkung auf Erythrozyten überhaupt keine Artspezifität.

Es herrscht jedoch Übereinstimmung in der Ansicht, daß die cytolytischen Wirkungen beider Toxine auf ihren jeweiligen Wechselwirkungen mit der Lipidbilayerphase von Zellmembranen beruhen (Seeger und Wachter, 1981; Bühring et al., 1983).

1.3.3.3 Phalloporin und Rubescensporin

Frühere Untersuchungen der cytolytischen Wirkungsweise des Phallolysin ließen auf die Bildung kationenpermeabler Kanäle in den Lipidbilayerbereichen von Zellmembranen schließen (s.o.). Dies war der Anlaß, die Wirkung von Präparationen des wasserlöslichen Proteinanteils aus *Amanita phalloides* auf künstliche planare Lipidmembranen unter Anwendung eines elektrochemischen Meßverfahrens (Kap. 2.2.2) zu untersuchen. Der wesentliche Vorteil dieser Methode ist die sehr hohe erreichbare Meßempfindlichkeit, um leitfähigkeitsverändernde Effekte bestimmter Stoffe auf Lipidmembranen nachweisen zu können. Mit einem geeigneten elektronischen Aufbau (Kap. 2.2.2.4) ist es sogar möglich, Ionenströme durch einzelne Kanal-moleküle in planaren Lipidmembranen sichtbar zu machen. Auf diese Weise

gelang es zu zeigen, daß Präparationen des wasserlöslichen Proteinanteils von *Amanita phalloides*, in denen das hämolytisch wirksame Phallolysin in hoher Konzentration vorliegt, in der Tat ein Protein enthalten, das in künstlichen Lipidmembranen diskrete Änderungen der Membranleitfähigkeit hervorzurufen vermag. Diese sind bei einer anliegenden Membranspannung als rechteckförmige Stromsignale zu erkennen (Abb. 1.8a; Wilmsen, 1983).

Ein Vergleich mit Abb. 1.4 zeigt die qualitative Ähnlichkeit dieser Ereignisse mit den Stromfluktuationen biologischer Membrankanäle wie des nAChR-Kanals und Ca^{++} -abhängiger K^{+} -Kanäle. Der in *Amanita phalloides* enthaltene Ionenkanal öffnet und schließt wie die biologischen Membrankanäle nach dem Alles-oder-nichts-Prinzip, wobei im offenen Zustand ein definierter Leitwert angenommen wird. Auffällig ist dabei das Auftreten sogenannter Bursts, die durch lange Ruhephasen, die sogenannten Interburstintervalle, getrennt sind.

Wesentliche Grundeigenschaften dieses Kanaltyps sind seine pH- und Spannungsabhängigkeit (Abb. 1.8b). Die Offenwahrscheinlichkeit p_o einzelner Kanäle (s. Kap. 1.1.5) nimmt in sigmoider Weise in Richtung positiver Membranspannungen (Vorzeichen bezogen auf die Proteinzugabeseite der Membran) zu. Parallel dazu beeinflusst die H^{+} -Ionenkonzentration die Einzelkanalkinetik: Eine Erniedrigung des pH-Wertes erhöht die Wahrscheinlichkeit, einen Kanal bei einer gegebenen Spannung im offenen Zustand zu finden, und bewirkt daher eine Kurvenverschiebung entlang der Spannungsachse nach links. Umgekehrt führt eine Alkalisierung der wäßrigen Elektrolytlösung zu einer Herabsetzung der Offenwahrscheinlichkeit p_o und entsprechend zu einer Kurvenverschiebung nach rechts (Wilmsen, 1983; Wilmsen et al., 1985).

Bei früheren Untersuchungen wurde eine Identität des cytolytisch wirksamen und des kanalbildenden wasserlöslichen Proteins in *Amanita phalloides* vorausgesetzt. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, daß das Hämolyisin und der Kanalbildner zwei unterschiedliche Proteine darstellen: Trennt man den wasserlöslichen Proteinanteil aus *A. phalloides* über eine S300-Sephacryl-Säule auf, so verteilen sich die Bereiche maximaler Kanal- und Hämolyseaktivität auf unterschiedliche Proteinfractionen (Abb. 1.9). Im Falle einer Identität beider Proteine ist dagegen eine gleichartige Verteilung zu erwarten.

Erst nachdem die regulatorischen Mechanismen, die den Kanaleinbau steuern, besser verstanden und analysiert worden waren, konnten derartige quantita-

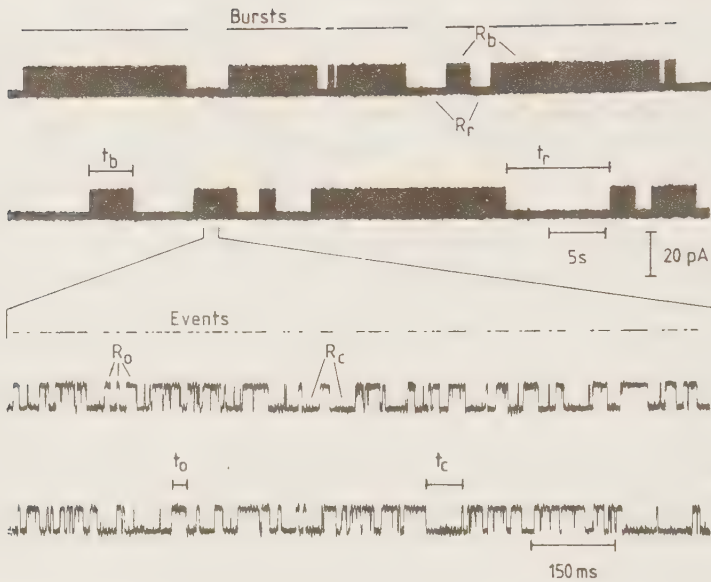


Abb. 1.8a: Einzelkanalfluktuationsspur des Phalloporins.

Obere Spur: Über einen längeren Zeitraum gesehen tritt die Kanalaktivität in Ereignisgruppen, sog. "Bursts" auf. Die Kanalzustände sind mit R_b (Burst) und R_r (Interburst) bezeichnet. t_b und t_r geben die Verweildauern im jeweiligen Zustand an.

Untere Spuren: Bei höherer Zeitauflösung lassen sich innerhalb eines Bursts die geschlossenen und geöffneten Zustände des Kanals R_c und R_o darstellen. Der Kanal kann offenbar mindestens zwei nichtleitende Zustände R_c und R_o annehmen, die sich in ihren mittleren Lebensdauern unterscheiden.

Membranzusammensetzung: 1,3-SMPC; 1,2-DOPS; Cholesterol (7:2:1)

Elektrolytlösung: 1 M NaCl; 10 mM Hepes, pH 7.5

Membranspannung: + 98 mV

Temperatur: + 37 °C

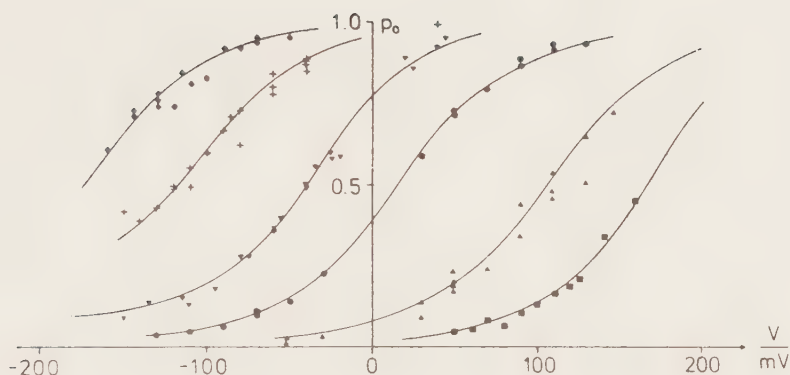


Abb. 1.8b: Die Offenwahrscheinlichkeit p_o von Phalloporineinzelkanälen als Funktion der Membranspannung bei 6 verschiedenen pH-Werten.

(◆) pH 5.5; (+) pH 6.0; (▼) pH 6.5; (●) pH 7.0; (▲) pH 7.5;
(■) pH 8.1

Membranzusammensetzung: 1,3-SMPC; 1,2-DOPS; Cholesterin (7:2:1)

Elektrolytlösung: 1 M NaCl; 10 mM Puffer

Temperatur: 37 °C

Aus Wilmsen, 1983

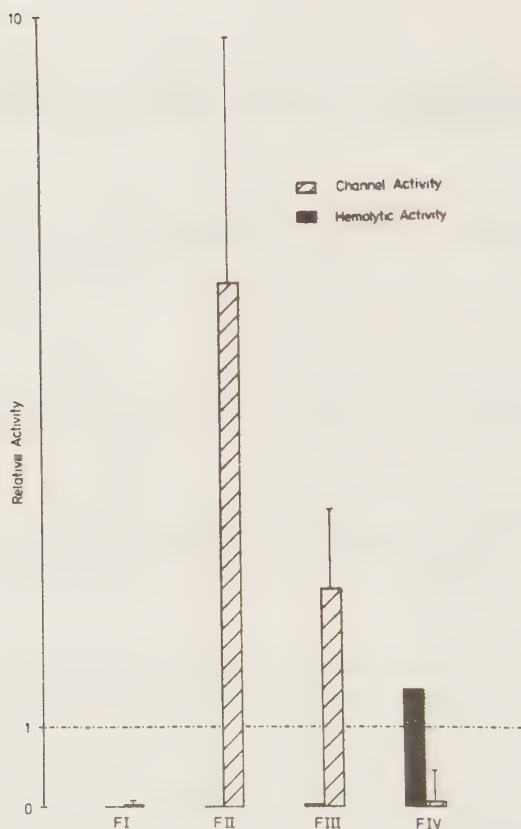


Abb. 1.9: Die Verteilung der hämolytischen und kanalbildenden Aktivität in den 4 Fraktionen des S300-Sephacryl-Säuleneluats des wasserlöslichen Proteinanteils von *Amanita phalloides*. Die relativen Aktivitäten sind in Bezug zur Aktivität des Ammoniumsulfat-Proteinpräzipitats als Standard angegeben (gestrichelte Linie = 1). Bei den Bilayerexperimenten wurde jeweils mit einer konstanten Proteinkonzentration von 0.28 µg/ml auf der cis-Seite gemessen. Als relatives Maß der Kanalbildungsaktivität wurde die maximale Steigung der Inkorporationskurven $(\Delta N/\Delta t)_{\max}$ bestimmt, die proportional zu der Phalloporinkonzentration in der Wasserphase ist (Kap. 3.1.1.2). Die hämolytische Aktivität wurde nach Faulstich und Weckauf-Bloching, 1974, bestimmt.

Der relative Anteil des Kanalbildners Phalloporin am wasserlöslichen Gesamtprotein ist am höchsten in der Fraktion II, während die Fraktion IV am stärksten hämolytisch wirksam ist.

Die Bestimmung der hämolytischen Wirksamkeit wurde von Dipl.-Biol. I. Helbig durchgeführt.

Die Versuchsbedingungen für die Bilayerversuche finden sich unter Abb. 3.9.

tive Tests der kanalbildenden Aktivität durchgeführt werden. Eine wichtige Grundlage dafür stellen die Untersuchungen der pH- und der Konzentrationsabhängigkeit des Phalloporineinbaus in Lipidmembranen dar, die zentrale Punkte dieser Arbeit sind (Kap. 3.1.1).

Um dieser gefundenen Diskrepanz gerecht zu werden, werden im Rahmen dieser Arbeit die hämolytisch wirksamen und die kanalbildenden Substanzen aus *A. phalloides* und *A. rubescens* formell als jeweils zwei verschiedene Proteine betrachtet. Im folgenden werden daher im Zusammenhang mit der cytolytischen Aktivität die Bezeichnungen *Phallolysin* und *Rubescenslysin* verwendet, bei der Beschreibung der kanalbildenden Proteine jedoch die Bezeichnungen *Phalloporin* und *Rubescensporin*. Diese "differenzierende Nomenklatur" soll der Tatsache Rechnung tragen, daß die hämolytische und die kanalbildende Aktivität entgegen früheren Annahmen durch jeweils zwei verschiedene Proteine vermittelt werden.

Eine höhere Aufreinigung und bessere Trennung der hämolytischen und der kanalbildenden Proteine sowie eine detailliertere biochemische Charakterisierung als es im Rahmen dieser Arbeit möglich war, ist gegenwärtig das Thema einer gesonderten Dissertation in derselben Arbeitsgruppe (Helbig, in Vorbereitung). Diese zur Zeit laufenden Untersuchungen haben auch vergleichende quantitative Tests der Hämolyse- und Kanalaktivität für den wasserlöslichen Proteinanteil aus *A. rubescens* zum Gegenstand.

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt auf der Untersuchung der Mechanismen, die dem Einbau und der Kanalbildung von Phalloporin und Rubescensporin zugrunde liegen. Die kanalbildenden Eigenschaften des Rubescensporins werden an dieser Stelle zum ersten Mal dargestellt, während die Untersuchung der pH- und spannungsabhängigen Einzelkanalkinetik des Phalloporins das Thema der Diplomarbeit waren (Wilmsen, 1983).

1.4 Problemstellung

Phallolysin und Rubescenslysin sind zwei hochwirksame Cytolysine aus Pilzen der Gattung *Amanita*. Für das Phallolysin schlug man aufgrund kinetischer Messungen des Hämolyseprozesses einen Kanalbildungsmechanismus in Zellmembranen vor (Seitz et al., 1981).

Im Rahmen einer Diplomarbeit konnte prinzipiell nachgewiesen werden, daß Präparationen des wasserlöslichen Proteinanteils aus *A. phalloides* ein Protein enthalten, das die Leitfähigkeit künstlicher planarer Lipidmem-

branen diskret zu erhöhen vermag (Wilmsen, 1983). Darüber hinaus wurden grundlegende Eigenschaften dieses Kanalbildners beschrieben wie die pH- und die Spannungsabhängigkeit seiner Schaltkinetik. Die Mechanismen, die zu dem Einbau dieses Kanals in Lipidbilayer führen, blieben damals jedoch noch wenig verstanden.

Der erste Aufgabenbereich bestand daher darin, die Einbaureaktion des Phalloporins quantitativ detailliert zu beschreiben und ihre Abhängigkeit von äußeren Faktoren darzustellen. Das eröffnete darüber hinaus den Weg, den Kanalbildungsmechanismus des Phalloporins in einem Vielkanalsystem zu analysieren und mit dem Einzelkanalverhalten zu vergleichen.

Das Rubescenslysin zeigt im Gegensatz zum Phallolysin eine mehr detergensartige Wirkung auf Zellmembranen. Auch hinsichtlich der biochemischen und physikalischen Eigenschaften unterscheiden sich die beiden Amanita-Cytolysine deutlich.

Der zweite Aufgabenbereich dieser Arbeit sollte daher sein, die Wirkung von Präparationen des wasserlöslichen Proteinanteils von *A. rubescens* auf künstliche planare Lipidmembranen zu untersuchen, zumal für eine Reihe anderer detergensartig wirkender Hämolysine spezifische, leitfähigkeits-erhöhende Wirkungen auf Lipidbilayer aufgezeigt werden konnten (Kap. 1.3.2). Das beinhaltet, die Effekte des Rubescensporins auf künstliche Lipidmembranen mit dem charakteristischen Kanalbildungsmechanismus des Phalloporins unter elektrochemischen Gesichtspunkten zu vergleichen und wesentliche Unterschiede in der leitfähigkeitserhöhenden Wirkung der beiden untersuchten Kanalbildner – sowohl auf der Einzelkanal- als auch auf der Vielkanalebene – herauszustellen.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

2.1.1 Feinchemikalien und Lösungsmittel

Von der Firma Riedel de Haen, Seelze, wurden die Salze NaCl, KCl und CaCl₂ sowie die Säuren HCl, H₂SO₄ und H₂NO₃ bezogen. Von der Firma E. Merck, Darmstadt, wurden LiCl, BaCl₂ und MgCl₂ geliefert. Von der Firma Sigma stammen die Puffersubstanzen Tris und Hepes. Mes wurde von der Firma Serva, Heidelberg, bezogen.

Methanol und Äthanol waren von der Firma Riedel de Haen, Hexan und Chloroform von der Firma J. T. Baker Chemicals B.V., Deventer, Holland.

Alle aufgeführten Feinchemikalien und Lösungsmittel wurden mit dem Reinheitsgrad "zur Analyse" verwendet.

Zum Herstellen der Elektrolytlösungen wurde ausschließlich zweifach quartzdestilliertes Wasser (Aqua bidest) verwendet.

2.1.2 Kanalbildende Substanzen

Die Experimente wurden mit teilweise aufgereinigten Präparationen von Phallolysin und Rubescenslysin ausgeführt, die jedoch frei sind von den toxischen Oligopeptiden (Wieland und Faulstich, 1978). Der relative Anteil der Cytolysine Phallolysin und Rubescenslysin am Gesamtprotein ist hoch. Nach einer Ammoniumsulfatfällung des Pilzhomogenisats besteht der Proteinanteil zu etwa 20 Prozent aus Phallolysin (Faulstich et al., 1983). Die apparente hämolytische Aktivität der benutzten Proben betrug 4800 Hämolytische Einheiten (H.U.)/mg Protein (Faulstich und Weckauf-Blöching, 1974).

Rubescenslysin-Präparationen wurden durch eine entsprechende Ammoniumsulfatfällung gewonnen. Ihre apparente spezifische Aktivität betrug 640 H.U./mg Protein.

Beide Präparationen wurden als gefriergetrocknetes Pulver im Exsikkator bei 4 °C aufbewahrt. Zum experimentellen Gebrauch wurde eine Stammlösung der absoluten Konzentration 1 mg/ml in einem Puffer folgender Zusammensetzung angesetzt: 150 mM NaCl; 10 mM CaCl₂; 5 mM MgCl₂; 10 mM Hepes, pH 7.5;

0.002 % (w/v) Na-azid. Gelöstes Phalloporin ist stabil und zeigt noch nach mehreren Wochen Kanalaktivität ohne meßbaren Verlust. Die Kanalaktivität von Rubescensporin-Stammlösungen nimmt dagegen nach einigen Tagen etwas ab. Phalloporin-Stammlösungen wurden daher alle 2-3 Tage, Rubescensporin-Stammlösungen dagegen täglich frisch angesetzt.

2.1.3 Lipide

Für die Bildung künstlicher Lipidmembranen nach der Montal-Mueller-Technik (Kap. 2.2.1.2) wurden die folgenden Phospholipide verwendet:

1-Palmitoyl-2-Oleoyl-Glycero-3-Phosphocholin (1,2-POPC),
1,2-Dioleoyl-Glycero-3-Phosphoserin (1,2-DOPS),
1-Palmitoyl-2-Oleoyl-Glycero-3-Phosphoglycerol (1,2-POPG) und
1,2-Dioleoyl-Glycero-3-Phosphoäthanolamin (1,2-DOPE) wurden von der Firma Avanti Polar Lipids, Birmingham (USA), bezogen.
1-Stearoyl-3-Myristoyl-Glycero-2-Phosphocholin (1,3-SMPC) sowie ein Teil des 1,2-DOPS wurden von Prof. Dr. H. Eibl vom Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen, synthetisiert (Eibl, 1980; Eibl et al., 1983; Eibl, 1984)*.

Ei-Phosphatidyläthanolamin (Ei-PE) wurde über Säulenchromatographie aus frischen Eiern gewonnen (Bergelson, 1980). Cholesterol (Reinheitsgrad puriss.) wurde von der Firma Fluka AG, Buchs (Schweiz), bezogen und vor Verwendung umkristallisiert (Gelfert-Peukert, 1986).

1,2-SMPC, 1,2-POPC, 1,2-DOPE und Ei-PE, sind Phospholipide, die bei neutralen pH-Werten keine Überschußladung besitzen und neutral sind. Bei 1,2-DOPS und 1,2-POPG handelt es sich um Phospholipide, die bei neutralen und schwach sauren pH-Werten eine negative Nettoladung tragen. Das Vorhandensein dieser Phospholipide in Lipidmembranen führt zu negativen Oberflächenladungen an der Wasser-Bilayer-Grenzfläche.

Vor dem experimentellen Gebrauch wurden von den verwendeten Lipiden Stammlösungen in organischen Lösungsmitteln hergestellt: 1,2-POPC (25 mg/ml) in Äthanol; 1,2-DOPS, 1,2-POPG, 1,2-DOPE und Ei-PE (25 mg/ml) in Chloroform; Cholesterol (10 mg/ml) in Chloroform.

* Herrn Prof. Dr. H. Eibl sei an dieser Stelle ausdrücklich dafür gedankt, daß er die oben genannten Substanzen freundlicherweise zur Verfügung stellte und somit zum Gelingen meiner Arbeit beitrug.

Diese Stammlosungen wurden unter einer Stickstoffatmosphäre bei -40°C gelagert und sind in dieser Form über einen längeren Zeitraum verwendbar. Zur Herstellung von Montal-Mueller-Membranen wurden aus den Stammlosungen Mischungen dieser Lipide im gewünschten molaren Verhältnis hergestellt und in dem leicht flüchtigen organischen Lösungsmittel n-Hexan gelöst. Dazu wurden die gekühlten Lipidstammlosungen langsam bei Raumtemperatur aufgetaut, entsprechende Mengen in ein hochvakuumstables Spitzkölbchen überführt und durch N_2 -Begasung vorgetrocknet. Da zur Ausbildung von elektrisch und mechanisch stabilen Lipidbilayern mit geringer Eigenleitfähigkeit die restlose Entfernung u.a. des Lösungsmittels Chloroform unabdingbare Voraussetzung ist, wurde der vorgetrocknete Lipidfilm anschließend für mindestens 2 Stunden einem Hochvakuum ausgesetzt (Virtis-Lyophilisator, Druckskalierung 30 micron). Danach wurde die getrocknete Lipidmischung in n-Hexan in einer Konzentration von 4-5 mg/ml aufgenommen. Diese Lipidmischungen wurden für 1-2 Tage verwendet.

Für die in dieser Arbeit aufgeführten Experimente wurden, wenn nicht anders angegeben, hauptsächlich folgende Lipidmischungen im molaren Verhältnis verwendet:

- 1.) 1,2-POPC; 1,2-DOPS; Cholesterol (7:2:1)
- 2.) 1,2-POPC; Ei-PE; 1,2-POPG; Cholesterol (6:2:1:1)

Die Wahl dieser Lipidmischungen erfolgte in Anlehnung an die von Bühring et al. (1983) durchgeführten Versuche mit Phallolysin an Lipidvesikeln. Das zum Herbeiführen einer negativen Oberflächenladung verwendete 1,2-DOPS wurde in einigen Versuchen durch das ebenfalls negativ geladene 1,2-POPG ersetzt. Dieser Austausch zeigt keinen Einfluß auf die Kanaleigenschaften beider Kanalbildner.

2.2 Experimentelles

2.2.1 Planare Lipidmembranen

2.2.1.1 Mueller-Rudin-Technik

Aufgrund ihres amphiphilen Charakters vermögen Phospholipide in wäßrigen Phasen spontan ausgedehnte, lamellare Strukturen (Bilayer) zu bilden. Diese Eigenschaft macht man sich zur Bildung künstlicher Lipidbilayer, z.B. in Vesikeln, zunutze, die in ihrer Struktur den Lipiddoppelschichten von Zell-

membranen entsprechen. 1962 entwickelten P. Mueller et al. erstmals ein verblüffend einfaches Verfahren, das die Herstellung planarer Lipidmembranen als Untersuchungsobjekte erlaubte (Abb. 2.1). Planare Lipidmembranen haben gegenüber Vesikelbilayern den Vorteil, daß man an ihnen eine wohldefinierte elektrische Spannung anlegen und gleichzeitig die resultierenden Membranströme und Membranleitfähigkeiten bequem messen kann. Planare Lipidmembranen sind daher eine ausgezeichnete Methode, um elektrische Eigenschaften von Lipidmembranen und darin enthaltener Transportsysteme zu untersuchen.

Unter Verwendung dieser Technik ließ sich zum ersten Mal, noch vor Einführung der Patch-clamp-Technik, zeigen, daß kanalbildende Proteine die Leitfähigkeit von Lipidmembranen rechteckförmig um diskrete Werte zu verändern vermögen (Mueller und Rudin, 1963; Bean et al., 1969).

2.2.1.2 Montal-Mueller-Technik

Das im vorhergehenden Kapitel vorgestellte Verfahren ermöglicht die Herstellung planarer Lipidbilayer, die zu einem nicht unerheblichen Anteil noch das organische Lösungsmittel n-Dekan enthalten. Einige untersuchte Kanalproteine werden jedoch in Gegenwart organischer Lösungsmittel in ihrer Funktion beeinträchtigt oder überhaupt funktionsunfähig (Hanke, 1984).

In Abwandlung der Mueller-Rudin-Technik entwickelten Montal und Mueller (1972) ein Verfahren, das die Herstellung nahezu lösungsmittelfreier Lipidbilayer ermöglicht. Prinzipiell verwendet man dabei wie bei der Mueller-Rudin-Technik auch ein Teflonkammersystem, das in der Mitte durch eine Teflonwand mit einer Blende unterteilt ist. Die Lösungsmittelfreiheit wird erreicht, indem anstelle des schwer flüchtigen n-Dekans das leicht flüchtige n-Hexan oder n-Pentan als organisches Lösungsmittel für die Lipide verwendet wird. Die Abb. 2.2 stellt dieses Verfahren im einzelnen dar. Beide Kammern sind mit einer Elektrolytlösung gefüllt, deren Oberflächen sich zunächst unterhalb der Blende befinden. Auf beiden Oberflächen wird nun eine definierte Menge einer Lipid/n-Hexan-Lösung gespreitet. Das leicht flüchtige Hexan verdunstet rasch, und auf der Luft-Wasser-Grenzfläche verbleiben allein die Phospholipidmoleküle, die sich wegen ihres amphipathischen Charakters in einer Monoschicht anordnen, wobei ihr polarer Molekülteil in die Wasserphase, die unpolaren Fettsäurereste in die Luft ragen. Hebt man nun den Wasserspiegel auf einer Seite an, so überspannt

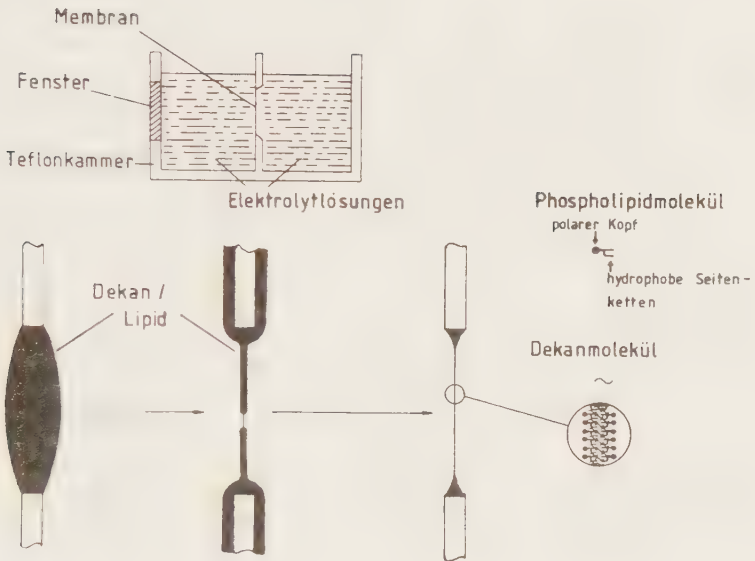


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Mueller-Rudin-Technik. Die Membran entsteht in der Blende der Querwand, die die massive Teflonkammer in zwei mit Elektrolyttlösungen gefüllte Hälften unterteilt (oben). In der Vorderhälfte befindet sich ein Glasfenster, durch das man die Bildung der *black lipid membrane* mit Hilfe eines Fernrohrs beobachten kann. Dazu wird zunächst ein Tropfen einer Lipid/n-Dekan-Lösung auf die Blende aufgebracht (unten). Die so entstandene Lamelle wird durch Lösungsabfluß über die Teflonwand dünner, bis an einer Stelle spontan ein Übergang zu einem sehr viel dünneren, schwarzen Bereich stattfindet (unten Mitte). Dieser breitet sich mit der Zeit aus und überspannt im Endstadium als schwarze Lipidmembran die Blendenöffnung (unten rechts). Diese künstliche planare Bilayerstruktur enthält zu einem hohen Anteil noch das Lösungsmittel n-Dekan. Nach Bamberg et al., 1974

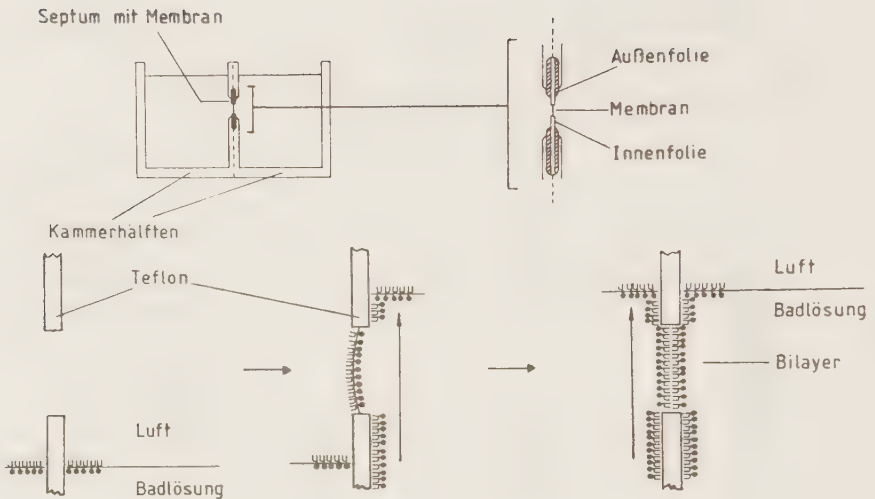


Abb. 2.2: Herstellung von lösungsmittelfreien Montal-Mueller-Membranen.

Oben: Das Kammersystem besteht aus zwei zusammengesetzten Teflonküvetten, zwischen die ein Sandwichseptum eingespannt ist. Die Lipidmembran überspannt die Blendenöffnung in dem dreischichtigen Sandwichseptum. Das Sandwichseptum besteht aus einer dünnen Innenfolie und zwei ringförmigen Außenfolien, die ihm die mechanische Stabilität verleihen (rechts).

Unten: Man bildet den künstlichen planaren Lipidbilayer dadurch, indem man zwei lösungsmittelfreie Lipidmonolayer auf den Oberflächen der beidseitigen Badlösungen durch sukzessives Anheben des Wasserspiegels über die Blendenöffnung gegeneinanderlagert. Die Monolayer entstehen spontan, wenn man auf den Oberflächen der Badlösungen jeweils eine geringe Menge einer Lipid/n-Hexan-Lösung spreitet.

Montal-Mueller-Membranen enthalten im Unterschied zu den Mueller-Rudin-Membranen (s. Abb. 2.1) kein organisches Lösungsmittel mehr.

Nähere Erläuterungen s. Text.

eine Monoschicht die Blendenöffnung, wobei die Fettsäurereste in die gegenüberliegende Kammer zeigen. Wird der gleiche Vorgang auch auf der anderen Seite ausgeführt, bildet sich in der Blende ein Lipidbilayer durch Gegeneinanderlagern zweier Monolayer. Seine apolaren Fettsäurereste zeigen nach innen, während die polaren Lipidköpfe der Wasserphase zugewandt sind.

Eine ähnliche Methode verwendeten erstmals Schindler und Rosenbusch (1978), bei der die Ausbildung der Lipidmonolayer nicht mit einem in organischem Lösungsmittel gelösten Lipid, sondern durch Lipidvesikel in der Elektrolytlösung erfolgte. Außerdem benutzten sie ein modifiziertes, zweiseitiges Kammersystem, das aus zwei einzelnen, zusammengesetzten Teflonküvetten besteht. In diesem ist die Blendenöffnung nicht mehr direkt in der Trennwand eines aus einem Stück gefrästen Kammersystems vorhanden, sondern auf einer dünnen Teflonfolie, die zwischen den beiden Kammern eingespannt wird (Schindler und Feher, 1976; Abb. 2.2). Diese Septentechnik hat sich als vorteilhaft erwiesen, da sie die kontrollierte Herstellung von Blendenöffnungen geringen Durchmessers (0.1-0.5 mm) und somit von Bilayern möglichst geringer Fläche erlaubt. Dies bringt eine Reihe meßtechnischer Verbesserungen mit sich, da man wegen der geringen zu messenden Ströme hohe Anforderungen an die elektrische Meßempfindlichkeit, die wesentlich von der Größe der Bilayerfläche abhängt, stellen muß.

Bei den durchgeführten Versuchen wurden lösungsmittelfreie Lipidbilayer verwendet und daher die Montal-Mueller-Technik benutzt. Hierzu wurde das zweigeteilte Kammersystem mit der Septentechnik verwendet. Dieser Meßaufbau wird in den folgenden Kapiteln im einzelnen beschrieben.

2.2.2 Die Meßapparatur

2.2.2.1 Mechanischer Aufbau

Der Kern des mechanischen Aufbaus für die Montal-Mueller-Technik ist das zweigeteilte Kammersystem, bestehend aus zwei einzelnen, zusammengesetzten Teflonküvetten mit je einer konischen Bohrung in einer Wand und dem Teflonseptum mit der Blendenöffnung, das zwischen beide Kammerhälften eingespannt wird. Ein Spannrahmen aus Metall hält das System mechanisch zusammen. Die Teflonsepten werden nach der von Schindler entwickelten Methode hergestellt, wobei das Verfahren von Hanke (1981) wie folgt modifiziert wurde: Man verwendet zwei Teflonfolien unterschiedlicher Dicke. Aus einer dünnen

Teflonfolie (Dicke 6 μm , Firma M. Huth Industrietechnik GmbH, Starnberg) werden kreisrunde Scheiben mit einem Durchmesser von 12 mm ausgestanzt. Diese dünnen Scheiben tragen später in ihrer Mitte die Blendenöffnung. Außerdem werden aus einer zweiten, dickeren und glasfaserverstärkten Teflonfolie (80 μm Dicke, Firma Breitenbach, Wuppertal) Ringe mit einem Außendurchmesser von 12 mm und einem Innendurchmesser von 5 mm ausgestochen. Diese Teile werden in Chloroform und Methanol gereinigt, anschließend je eine dünne Teflonscheibe zwischen zwei dicke Teflonringe gelegt und in einem Stahlblock fest eingespannt. Dieser wird in einem Keramikofen zusammen mit den Folien für ca. 90 Sekunden dynamisch erhitzt, wobei das Teflon gerade seine Erweichungstemperatur (etwa 400 °C) überschreitet und die Folien durch den Druck des Spannblocks fest zusammengebacken werden. Anschließend wird der Stahlblock in einem Wasserbad (Aqua bidest) abgeschreckt. Die drei Folienlagen sind nun elektrisch isolierend miteinander verschmolzen, wobei die äußeren, dickeren Ringe diesem Septenrohrling die mechanische Stabilität verleihen. Meist verbleiben in dem freigebliebenen, mittleren Teil der dünnen Folie nach dem Backen wellige Unebenheiten, die sich aber beseitigen lassen, indem man das Septum mit einer Zange für 1-2 Sekunden in den Ofen hält. Das Einschmelzen der Blendenöffnung in den freien mittleren Teil der dünnen Folie erfolgt durch zentriertes Einspannen des Septenrohrlings in eine 40000-V-Funkenstrecke. Durch geeignete Wahl des Elektrodenabstandes und der Anzahl der aufeinanderfolgenden Entladungsfunken kann man kontrolliert randscharfe und kreisrunde Blendenöffnungen mit Durchmessern von 80-250 μm erzielen. Das Endprodukt ist ein mechanisch stabiles *Sandwichseptum*, das man bis zu seiner Verwendung staub- und fettfrei aufbewahrt.

Für ein Experiment werden zunächst zwei Teflonhalbküvetten für einige Minuten in Aqua bidest gekocht. Anschließend werden die die konische Bohrung tragenden und später aneinandersitzenden Flächen der Küvetten sehr dünn mit Silikonpaste bestrichen, um ein festes Zusammenhalten und eine elektrische Isolierung zwischen den Kammerhälften zu gewährleisten. Ein Sandwichseptum wird nach einer kurzen Reinigung in n-Hexan und Vorbehandlung mit einer Hexan-Hexadekan-Lösung von außen auf die konische Bohrung einer Küvette gelegt und anschließend beide Küvettenhälften passgenau, Bohrung auf Bohrung, mit ihren silikonbestrichenen Seiten zusammengesetzt. Die Vorbehandlung des Sandwichseptums mit dem Kohlenwasserstoff Hexadekan erwies sich zum Ausgleichen eventuell verbliebener Randunschärfen als

geeignet und gewährleistet später eine größere mechanische Stabilität des Lipidbilayers. Die nun zusammengefügt Kuvettenhälften werden für die Dauer des Experiments in einem metallenen Spannrahmen zusammengepreßt und sind dadurch gut gegeneinander elektrisch isoliert, so daß an ihren Kontaktstellen keine Leckströme von Kammer zu Kammer auftreten können.

Abb. 2.3 zeigt in einem Blockdiagramm den gesamten Meßaufbau. Während des Versuchs befindet sich das Kammersystem samt Spannrahmen in einem massiven Metallblock, durch den das Zirkulationssystem eines Thermostaten (Lauda K 4R) verläuft. Damit ist die Möglichkeit zur Temperaturregulation gegeben. Die Kanalbildner werden nur einseitig in das cis-Kompartiment zugegeben (s.u.), in dem ein Magnetprüher (R) für eine permanente Durchmischung sorgt. Dieser wird von einem rotierenden Gegenmagneten, der auf einem Elektromotor unterhalb des cis-Kompartiments befestigt ist, gedreht.

Zur Abschirmung von äußeren elektrischen Störquellen, vor allem des lästigen 50-Hz-Netzbrumms, ist das gesamte Meßsystem in einem Faradayschen Käfig untergebracht. Eine Kammerhälfte (cis) ist über ihre Ag-AgCl-Elektrode mit einer externen, regulierbaren Spannungsquelle (Spannungsgeber) verbunden. An diese ist ein Funktionsgenerator angeschlossen. Dieser dient zum einen dazu, mit hoher Frequenz (50-100 Hz) kleine rechteckförmige Spannungspulse (Amplitude = 0.1 mV) additiv zu der bestehenden konstanten Membranspannung anzulegen und mit der Größe des resultierenden kapazitiven Umladestroms die Kapazität, und damit die Dicke der Lipidmembran, zu kontrollieren. Zum anderen können mit Hilfe des seriell geschalteten Funktionsgenerators, ausgehend von einer Haltespannung, die über den Spannungsgeber eingestellt wird, rechteckförmige Spannungssprünge (bis ± 200 mV) zu beliebigen Sprungspannungen ausgeführt werden (s. Spannungssprungexperimente in Kap. 3.1.2, 3.1.3 und 3.2.1).

Die andere Kammerhälfte (trans) ist über ihre Ag-AgCl-Elektrode mit einem Strom-Spannungs-Wandler verbunden, der die resultierenden Membran- und Kanalströme als Spannungen auf einem Oszillographenschirm (Tektronix 7623A) sichtbar macht. Einzelheiten des elektronischen Aufbaus sind im Kap.2.2.2.4 beschrieben. An den Ausgangsverstärker des Oszillographen ist ein Schreiber (W+W Electronic, Basel, Recorder 404) zur On-line-Aufzeichnung der Membranströme sowie ein FM-Magnetbandgerät angeschlossen.

Bei dem Spannungsgeber, dem Spannungsmeßgerät und den Funktionsgeneratoren handelt es sich um Eigenbaugeräte der Arbeitsgruppe (Dr. W. Hanke).

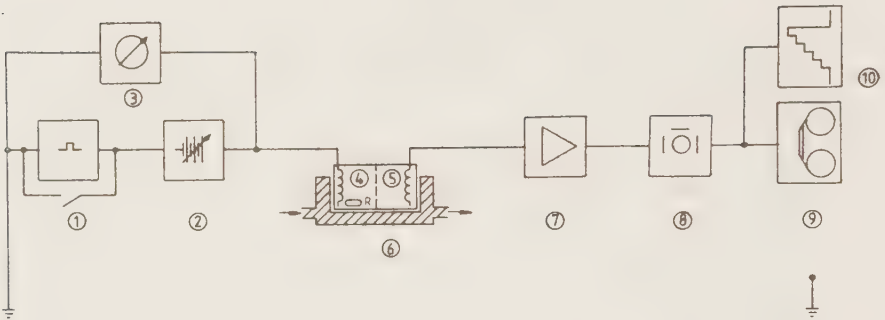


Abb. 2.3: Blockdiagramm des gesamten Meßaufbaus für die Montal-Mueller-Membranen

- (1) Funktionsgenerator
- (2) Spannungsgeber
- (3) Spannungsmeßgerät
- (4) cis-Kompartiment, über eine Ag-AgCl-Elektrode verbunden mit dem Spannungsgeber (R = Magnetrührer)
- (5) trans-Kompartiment
- (6) Metallblock zur Thermostatierung
- (7) Strom-Spannungs-Wandler, über eine Ag-AgCl-Elektrode verbunden mit dem trans-Kompartiment
- (8) Oszillograph
- (9) Magnetbandgerät
- (10) Schreiber zur On-line-Aufzeichnung von Daten

Unterhalb des cis-Kompartiments befindet sich ein Elektromotor mit einem Gegenmagneten (nicht eingezeichnet), mit dem der Magnetrührer R gedreht wird.

2.2.2.2 Reinigungsschritte

Bei der Messung von Membranströmen, vor allem aber bei der Messung von Einzelkanalströmen im pA-Bereich, handelt es sich naturgemäß um sehr empfindliche Messungen. Diese sind nur möglich, wenn die reine Lipidmembran eine möglichst geringe Eigenleitfähigkeit und eine ausreichende mechanische und elektrische Stabilität hat. Voraussetzung hierfür ist, daß jede Verunreinigung des verwendeten Lipids so weit wie möglich ausgeschlossen wird. Daher ist eine ausreichende Reinigung der verwendeten Kammerteile vor jedem Experiment unumgänglich. Dazu werden die Teflonküvetten zunächst mit Chloroform und Methanol vorgereinigt, um sie von verbliebenen Lipid- und Proteinresten zu befreien, und anschließend über Nacht einem Chromschwefelsäurebad unterzogen. Bei hartnäckigen Verunreinigungen folgt eine Reinigung in heißem Königswasser für ca. 10 Minuten. Anschließend werden die Küvetten für einige Stunden in 1 M KOH aufbewahrt, mindestens einen Tag in fließendem entsalztem Wasser gewässert und schließlich in Aqua bidest für einige Minuten gekocht.

Die Sandwichsepten werden im Einwegverfahren benutzt. Die Elektrolytlösungen werden unmittelbar vor Gebrauch mit einem Millipore Filter (Firma Sartorius, Pore Size 0.2 μm) gefiltert.

2.2.2.3 Perfusionsmethode

Für eine Reihe von Experimenten war es notwendig, die Elektrolytlösung im cis-Kompartiment während des Experiments zu wechseln. Dazu diente eine Perfusionsapparatur, die schematisch in Abb. 2.4 dargestellt ist. Das cis-Kompartiment ist zunächst mit einer Start-Elektrolytlösung (I) gefüllt und durch Silikonschläuche mit zwei gegensinnig angeordneten Perfusionsspritzen verbunden. Eine dieser Spritzen enthält die Austausch-Elektrolytlösung (II), während die andere zum Aufnehmen der Start-Elektrolytlösung dient. Die Perfusion erfolgt durch manuelle Bedienung einer Mechanik, wobei der Magnetrührer für eine permanente Durchmischung in der cis-Küvette sorgt. Während eines einmaligen Perfusionsdurchgangs wird die cis-Küvette mit dem etwa 10fachen ihres Eigenvolumens (3.7 ml) perfundiert. Der dadurch erzielte Verdünnungsfaktor der Startlösung I beträgt etwa $2 \cdot 10^4$. Um eine noch höhere Verdünnung zu erzielen, kann die Perfusion mehrfach wiederholt werden.

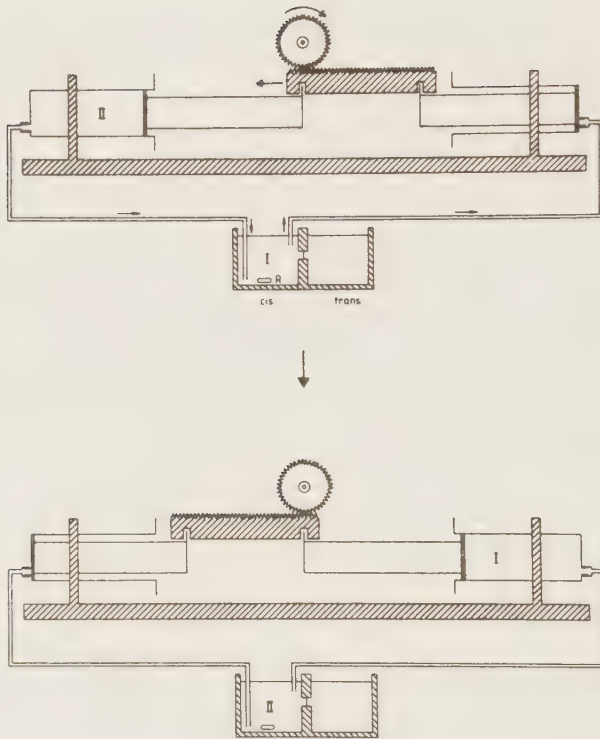


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der verwendeten manuellen Perfusionsmethode. Das mit den beiden Perfusionspritzen verbundene cis-Kompartiment ist zunächst mit der Start-Elektrolytlösung I gefüllt (oben). Eine Spritze enthält die Austausch-Elektrolytlösung II, die andere dient zum Aufnehmen der ausgetauschten Lösung. Ihre Kolben werden über eine manuell betriebene Mechanik gegensinnig bewegt, so daß Lösung I auf der cis-Seite gegen Lösung II ausgetauscht wird (unten). Der Magnetrührer R sorgt für eine permanente Durchmischung. Während eines Durchgangs wird im cis-Kompartiment eine Verdünnung der Lösung I von etwa $1 : 2 \cdot 10^4$ erzielt.

2.2.2.4 Elektronischer Aufbau

Bei Messungen von Membranströmen an künstlichen Lipidbilayern geringer Fläche ($1-2 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2$), vor allem aber bei Registrierungen der Ströme durch einzelne Membrankanäle, müssen naturgemäß sehr kleine Stromflüsse gemessen werden. Bei Vielkanalmessungen erwartet man absolute Werte von 10^{-9} bis 10^{-7} Ampere, während für Einzelkanalströme je nach Einzelkanalleitwert Ströme von wenigen Picoampere (10^{-12} A) typisch sind. Für die Messung derart kleiner Ströme erweisen sich sog. Strom-Spannungs-Wandler am geeignetsten. Dabei handelt es sich um hochempfindliche Stromverstärker, deren invertierender Eingang (virtuelle Erde) mit dem zu messenden Membranstrom I_m verbunden ist und die an ihrem Ausgang eine Spannung ($-U_a$) liefern, die proportional zu diesem Strom ist.

Ein solcher Meßkreis ist in Abb. 2.5 schematisch gezeigt. Sein Schaltplan wurde von Dr. W. Hanke in Anlehnung an Sigworth (1983) entworfen. Seine Ausgangsspannung U_a ist gegeben durch die Beziehung

$$U_a = -I_m \cdot R_f \quad (G1. 2.1)$$

U = angelegte Membranspannung; R_m = Membranwiderstand; I_m = Membran- bzw. Kanalstrom; R_f = Rückkopplungswiderstand

G1. 2.1 zeigt, daß die Größe des Ausgangssignals proportional zum Rückkopplungswiderstand R_f ist. Für Einzelkanalmessungen ist daher die Verwendung eines größeren Rückkopplungswiderstandes zu empfehlen, während für Vielkanalmessungen kleinere Widerstandswerte genügen. So wurde bei den im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Einzelkanalmessungen ein Strom-Spannungs-Wandler mit $R_f = 1000 \text{ M}\Omega$ benutzt, bei Vielkanalmessungen betrug $R_f = 100 \text{ M}\Omega$ (Abb. 2.5).

Ein guter Strom-Spannungs-Wandler soll bei möglichst geringem Verstärker-rauschen eine möglichst große Frequenzbandbreite und somit eine gute zeitliche Auflösung der betrachteten Stromsignale bieten. Dies wird durch den Rückkopplungswiderstand R_f und die dazu parallel liegende Rückkopplungs-kapazität C_f , zu der auch parasitäre Streukapazitäten beitragen, bestimmt. Prinzipiell ist die theoretisch erzielbare Frequenzbandbreite f_0 eines Strom-Spannungs-Wandlers gegeben durch die Beziehung:

$$2\pi f_0 = \frac{1}{R_f \cdot C_f} \quad (G1. 2.2)$$

Bei den nach Abb. 2.5 konzipierten Stromverstärkern tragen allein die parasitären Streukapazitäten zu der Rückkopplungskapazität C_f bei. Ihre Größe kann mit Hilfe einer einfachen Testanordnung leicht bestimmt werden. Bei den beiden verwendeten Strom-Spannungs-Wandlern wurde der Wert der parallel zu R_f liegenden Streukapazität mit ca. 0,5 pF bestimmt. Die damit theoretisch erzielbare Bandbreite beträgt dann nach Gl. 2.2 für den Einzelkanal-Stromverstärker ($R_f = 1000 \text{ M}\Omega$) etwa 320 Hz. Mit Hilfe des regelbaren Widerstandes R_t und der Zusatzkapazität C_1 kann die Bandbreite des in Abb. 2.5 dargestellten Strom-Spannungs-Wandlers über diesen theoretisch erreichbaren Wert angehoben werden (Sigworth, 1983). Auf diese Weise läßt sich mit einem R_f von 1000 M Ω nun eine maximale Bandbreite von 1 kHz erzielen.

In der Regel wurde das Signal mit dem am Eingangsverstärker des Oszillographen eingebauten Tiefpass-Vorfilter auf 1 kHz gefiltert. Das Stromrauschen des Einzelkanal-Stromverstärkers war dann etwa 0,5 pA (Spitze-Spitze-Wert).

Für den Vielkanal-Stromverstärker ($R_f = 100 \text{ M}\Omega$) liefert Gl. 2.2 eine maximale theoretische Bandbreite von 3,2 kHz. Mit Hilfe der in Abb. 2.5 dargestellten zusätzlichen Kompensationsschaltung (C_1 und R_t) kann man eine maximale Auflösung von etwa 20 kHz erzielen. Das Stromrauschen dieses Verstärkers beträgt bei einer Tiefpass-Vorfilterung am Oszillographen von 1 kHz etwa 2 pA (Spitze-Spitze-Wert).

Um elektrostatische Störeinstreuungen zu eliminieren, ist der gesamte Meßaufbau in einem Faradayschen Abschirmgehäuse aus Aluminiumblech eingebaut, außerdem wird der Meßverstärker aus zwei 12-V-Autobatterien mit Strom versorgt, um Störeinstreuungen aus dem 50-Hz-Stromnetz zu vermeiden.

Die umgewandelten Stromsignale werden auf einem Speicheroszillographen (Tektronix 7623A) sichtbar gemacht und auf einem FM-Analogbandgerät (Racal Thermionic Store 4DS) und/oder auf einem Papierschreiber (W+W Electronic, Basel, Recorder 404) zur weiteren Datenauswertung gespeichert. Einzelkanalspuren wurden mit einer Bandgeschwindigkeit von 7,5 inch pro Sekunde aufgenommen, bei der die Bandbreite des Magnetbandgerätes etwa 5 kHz beträgt.

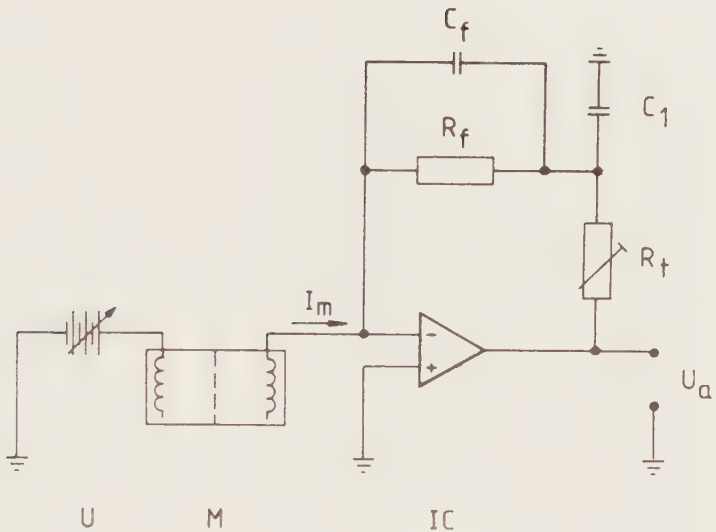


Abb. 2.5: Schaltung des elektronischen Meßkreises

U = variable externe Spannungsquelle

M = Membransystem

U_a = Ausgangsspannung des Verstärkers

I_m = Zu messender Vielkanal- bzw. Einzelkanalstrom

C_f = Rückkopplungskapazität (≈ 0.5 pF)

Vielkanalmessungen:

R_f = $100 \text{ M}\Omega$

R_t = Trimpoti (Maximalwert $100 \text{ k}\Omega$)

C_1 = 1 nF

IC = OP 3527 AM, Burr Brown

Einzelkanalmessungen:

R_f = $1000 \text{ M}\Omega$

R_t = Trimpoti (Maximalwert $1 \text{ M}\Omega$)

C_1 = $0.47 \text{ }\mu\text{F}$

IC = OPA 104 AM, Burr Brown

2.3 Auswertung der Versuchsdaten

2.3.1 Statistische Computerauswertung

Die statistische Analyse von Einzelkanalereignissen des Phalloporins erfolgte mit dem Laborcomputer (Digital MINC-11/23). Dazu wurden FORTRAN-Computerprogramme verwendet, die von Dr. C. Methfessel und B. Borutta entwickelt worden waren (Methfessel, 1983).

Die Einzelkanalfluktuationen werden als analoge Daten im On-line-Verfahren auf Magnetband gespeichert. Für ihre statistische Auswertung ist wichtig, daß die Bandaufnahmen frei von externen Störimpulsen und Drift in der Stromgrundlinie sind. Ferner muß sichergestellt sein, daß die gemessenen Stromfluktuationen nur von einem einzigen Kanal hervorgerufen wurden, da bei mehreren sich gleichzeitig öffnenden und schließenden Kanälen keine genaue Angabe mehr über das kinetische Verhalten eines individuellen Kanals gemacht werden können. Vor der statistischen Computerauswertung werden daher die analog gespeicherten Daten nochmals am Oszillographen auf ihre Güte hin überprüft. Da im Zuge dieser Auswertung die statistischen Daten innerhalb der Bursts interessierten, wurden schließlich nur solche Aufnahmestücke ausgewählt, die nicht durch Interburstphasen R_T (s. Kap. 1.3.3.3) unterbrochen sind. Diese lassen sich mit ihren signifikant längeren Lebensdauern leicht von den normalen geschlossenen Zuständen innerhalb der Bursts unterscheiden (s. Abb. 1.8a).

In einem ersten Schritt werden die Analogdaten über einen Analog-Digital-Wandler unter Verwendung des Programms IPOREN in den Rechner eingespielt. Dabei werden die Eingangsspannungen am Wandler mit einer Taktrate von 1 ms registriert und in digitalisierter Form auf der Magnetplatte des Rechners abgespeichert. Mit dem Programm LPOREN werden dann die Kriterien eingegeben, mit denen der Rechner zwischen verschiedenen Leitwertstufen unterscheiden kann.

Die Grundlage hierfür ist in diesem Fall das Schaltschema eines Ionenkanals, der nur zwischen einem leitenden Zustand R_O und einem nicht-leitenden Zustand R_C fluktuieren kann. Das kinetische Modell eines solchen 2-Zustands-Kanals wurde in Kap. 1.1.5 abgehandelt. Man legt nun einen Stromschwellenwert fest, der das Stromniveau des offenen und geschlossenen Zustandes definiert. Alle Datenpunkte, die diesen Schwellenwert überschreiten, werden vom Rechner als geöffnete, alle Punkte unterhalb dieses

Schwellenwertes als geschlossener Zustand des Kanals interpretiert. Die Höhe der Grenze wurde in der Regel so gewählt, daß sie 50 Prozent der jeweiligen Einzelkanal-Stromamplitude betrug. Die Anzahl der Datenpunkte zwischen zwei aufeinanderfolgenden Kreuzungen der Stromwerte mit dem Schwellenwert wurden als die Dauer eines geöffneten bzw. geschlossenen Zustands gezählt. Auf diese Weise erhält man die Verteilung der Lebensdauern der beiden Kanalzustände. Die eigentliche Bestimmung der mittleren Offen- und Geschlossenzeiten τ_o und τ_c erfolgte durch Berechnung der Zeitkonstanten τ für den exponentiellen Zerfall einer Population voneinander unabhängiger Kanalereignisse, der gemäß einer monomolekularen Reaktion erster Ordnung erfolgt (Kap. 1.1.5). Das Programm UPOREN paßt dazu die integrale Verteilung der gemessenen Lebensdauern an ein exponentielles Zerfallsgesetz der Form

$$N(t) = N(0) \cdot e^{-t/\tau} \quad (Gl. 2.3)$$

an. Ist $N(0)$ die Gesamtzahl aller analysierten Kanalereignisse, so ist $N(t)$ die Anzahl der Ereignisse, deren Lebensdauern länger als die Zeitspanne t ist. τ ist die mittlere Lebensdauer des betrachteten Kanalzustandes. Da sich sowohl die integrale Häufigkeitsverteilung des geschlossenen als auch des geöffneten Zustandes des Phalloporins nach Gl. 2.3 beschreiben läßt (Wilmsen, 1983), liefert sie unmittelbar die Werte für τ_o und τ_c .

Mit dem Programm PORWAR lassen sich schließlich die mittleren Wahrscheinlichkeiten p_o und p_c für den offenen und geschlossenen Zustand angeben. p_o wird als das Verhältnis zwischen der Summe aller Datenpunkte im geöffneten Zustand (oberhalb des Schwellenwertes) und der Gesamtdauer der analysierten Zeit berechnet. p_c wird entsprechend für alle Datenpunkte im geschlossenen Zustand angegeben.

2.3.2. Auswertungen von Schreiberregistrierungen

Die statistische Auswertung von Einzelkanalfluktuationen läßt sich am bequemsten mit dem Computer ausführen, da hier in der Regel bereits Bandaufzeichnungen von wenigen Minuten Dauer genügend Informationen enthalten, die für eine statistisch sichere Analyse völlig ausreichen.

Die Inkorporationsprozesse von Rubescensporin und Phalloporin wurden jedoch in der Regel über einen Zeitraum von 30-60 Minuten oder länger registriert.

Hier empfiehlt sich eher eine On-line-Aufzeichnung des Membranstroms mit Hilfe eines Schreibers. An Hand dieser Registrierungen erfolgte die manuelle Auswertung der interessierenden Daten. Im Falle des Phalloporins wurden auf diese Weise bestimmt: die Verzögerungszeit t_{lag} , die maximale Stromzuwachsrate $(\Delta I/\Delta t)_{max}$ sowie der jeweils nach 45 Minuten erreichte Membranstromwert I_{45} . Ein Beispiel einer solchen Originalregistrierung mit diesen Parametern ist in Abb. 3.4a gezeigt.

Aus den Einbaukurven des Rubescensporins wurden ermittelt: die Verzögerungszeit t_{lag} und der nach jeweils 10 Minuten erreichte Membranstromwert. Eine Registrierung dieser Art zeigt Abb. 3.32. Die Ermittlung der Zeitkonstanten τ des Stromzuwachses erfolgte aus der Geradensteigung bei halb-logarithmischer Auftragung des Membranstroms (Abb. 3.33).

Die Stromamplituden von Einzelkanalereignissen wurden in der Regel ebenfalls mit der Hand ausgewertet. Dazu wurden die auf Magnetband gespeicherten Stromfluktuationen mit einer verlangsamten Abspielgeschwindigkeit auf einen Schreiber überspielt.

2.4 Vorzeichenkonvention und Applikation von Kanalbildnern

Bei allen Versuchen mit Montal-Mueller-Membranen beziehen sich die Spannungsangaben mit ihren Vorzeichen auf diejenige Seite der Membran, die über die Ag-AgCl-Elektrode mit dem Spannungsgeber verbunden ist (Abb. 2.3). Dieses Kompartiment wird als *cis-Kompartiment* bezeichnet, die zugehörige Membranseite als *cis-Seite*. Die Ag-AgCl-Elektrode in der hinteren Kammer ist mit dem invertierenden Eingang des Operationsverstärkers verbunden und liegt auf virtuellem Erdpotential. Dieses Kompartiment wird als *trans-Kompartiment* bezeichnet, die Membranseite entsprechend als *trans-Seite*.

Ein positiver Strom entspricht einem Kationentransfer von der cis- zur trans-Seite und wird, sofern nicht anders angegeben, in Schreiberregistrierungen und Diagrammen als Ablenkung nach oben gezeigt. Negative Ströme sind entsprechend als Ablenkungen nach unten aufgezeichnet. Die Applikation der kanalbildenden Substanzen erfolgte in allen Versuchen nur einseitig in das Kompartiment auf der cis-Seite des vorgebildeten Bilayers.

3. Ergebnisse

3.1 Phalloporin

3.1.1 Einbau in planare Lipidmembranen

3.1.1.1 Spannungsinduzierter Einbau bei neutralem pH

Die Zugabe des Kanalbildners Phalloporin erfolgte jeweils in das cis-Kompartiment, nachdem eine Lipidmembran gebildet wurde. In Elektrolytlösungen mit neutralem bis schwach basischem pH (7.0-8.0) kommt es selbst in Gegenwart relativ hoher Proteinkonzentrationen zu keiner spontanen Kanalbildung durch Phalloporin, wenn keine Spannung über der Membran anliegt. Auch bei positiven und gering negativen Spannungen ($V > -100$ mV) läßt sich keine Inkorporation erzielen.

Eine Kanalaktivität des Phalloporins läßt sich bei neutralen bis basischen pH-Werten jedoch gezielt induzieren, indem man an den Bilayer hohe negative Spannungen anlegt ($V \leq -100$ mV) und zusätzlich nach einigen Minuten Spannungssprünge ausführt, im einfachsten Fall durch Aus- und Wiedereinschalten der Spannung (-100 mV; 0 mV; -100 mV). Dieser spannungsinduzierte Einbau einzelner Phalloporinkanäle ist in Abb. 3.1 gezeigt. Durch diese Methode läßt sich nach einem Spannungssprung in den meisten Fällen nur jeweils ein Phalloporinkanal aktivieren. Das zeigt, daß die Rate für einen spontanen Einbau von Phalloporin in planare Lipidmembranen bei neutralen und basischen pH-Werten der Elektrolytlösung sehr klein ist. Auch bei hohen Phalloporinkonzentrationen im cis-Kompartiment ($c > 100$ ng Protein/ml) lassen sich durch dieses beschriebene Verfahren kaum mehr als 10 Einzelkanäle nacheinander im Laufe eines Experiments aktivieren. Wurden an die Membran positive Spannungen angelegt oder blieben die Spannungssprünge aus, so kam es zu keiner Kanalaktivität.

Sobald ein Phalloporinkanal jedoch aktiviert ist, zeigt er sein charakteristisches, spannungsabhängiges Fluktuationsverhalten (Kap. 1.3.3.3). Die Abb. 3.1 zeigt, daß der leitende, offene Zustand bei positiven Spannungen mit deutlich höherer Wahrscheinlichkeit angenommen wird als bei negativen Spannungen. Nur in weniger als 2 Prozent aller Fälle wurde eine Spannungsabhängigkeit in der umgekehrten Richtung mit einer höheren Offenwahrscheinlichkeit bei negativen Spannungen gefunden.

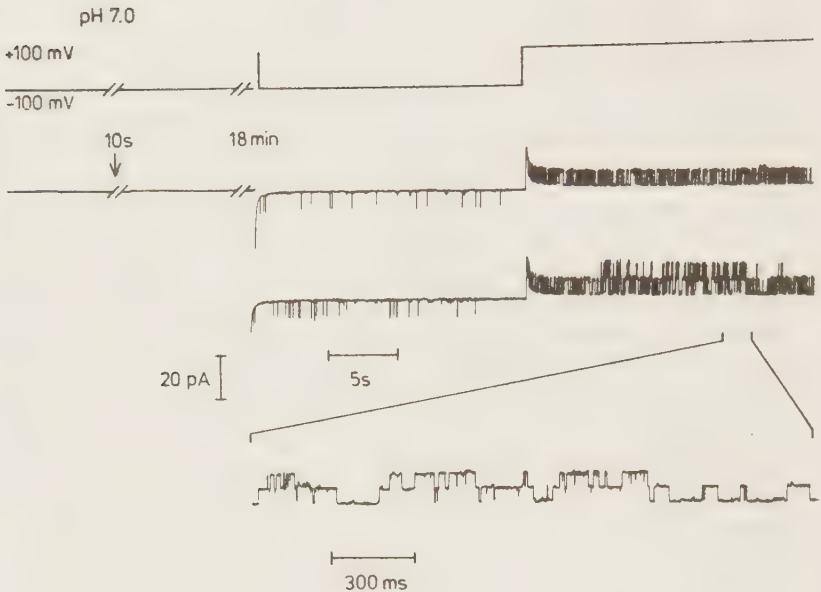


Abb. 3.1: Der spannungsinduzierte Einbau von Phalloporin in Lipidmembranen bei neutralem und basischem pH. Vor und unmittelbar nach der Zugabe von Phalloporin zur cis-Seite der Membran lassen sich keine Stromfluktuationen erkennen. Während der Applikation wurde die Stromspur für 10 s unterbrochen (Pfeil). Anschließend lag an der Membran für die Dauer von 18 min eine konstante Spannung von -100 mV an, ohne daß es zu einer Kanalaktivierung kam. Dann wurde die Spannung repetitiv aus- und wieder angeschaltet. Nach einigen Wiederholungen dieser Spannungssprünge wurde ein einzelner Phalloporinkanal aktiviert. Bei der negativen Haltespannung von -100 mV lassen sich einzelne Kanalöffnungen als kurze, nach unten gerichtete Stromspitzen erkennen. Bei +100 mV dagegen erscheint die Aktivität deutlich verstärkt, Kanalöffnungen sind nun häufiger. Dieses Verhalten beruht auf der spannungsabhängigen Einzelkanalkinetik des Phalloporineinzelkanals, die im Kap. 1.3.3.3 beschrieben wurde. Nach 3 weiteren Spannungssprüngen wurde ein zweiter Phalloporinkanal induziert. Die unterste Spur zeigt die übereinandergelagerten Öffnungsereignisse dieser Kanäle bei einer höheren Zeitauflösung.

Experimentelle Bedingungen:

Elektrolytlösung: 1 M KCl; 10 mM CaCl₂; 10 mM Hepes, pH 7.0
Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPS; Cholesterol (7:2:1)
Membranfläche: $1.5 \cdot 10^{-4}$ cm²
Proteinkonzentration: 0.28 µg/ml (cis)

Das gezeigte Fluktuationsverhalten läßt sich, einmal induziert, für die Dauer des Experiments über Stunden aufrechterhalten. Eine spontane Langzeitinaktivierung wird nicht beobachtet.

3.1.1.2 Die pH-Abhängigkeit der Einbauparameter

Bei neutralem oder leicht basischem pH-Wert baut sich Phalloporin, wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben, so gut wie nicht spontan in planare Lipidmembranen ein. Es bedarf unter diesen Umständen vielmehr eines zusätzlichen Anstoßes, hier in Form der Spannungssprünge, um einzelne Phalloporinkanäle zu induzieren. Die folgenden Kapitel beschreiben den *spontanen* Einbau von Phalloporin sowie dessen Steuerung durch äußere Einflüsse, vor allem durch den pH-Wert der Elektrolytlösung. Es zeigt sich, daß sich Phalloporin nur bei niedrigen pH-Werten ($\text{pH} < 6.5$) spontan in Lipidmembranen einzubauen vermag. Dies ist in Abb. 3.2 dargestellt. Liegt zu Beginn eines Experiments ein leicht basischer pH-Wert auf beiden Seiten der Membran vor, so kommt es wie oben beschrieben auch nach langer Wartezeit zu keiner Kanalaktivität, wenn an der Membran eine positive Spannung anliegt und keine Spannungssprünge ausgeführt werden. Senkt man jedoch den pH-Wert nur auf der cis-Seite der Membran durch Zugabe von Säure ab, so nimmt der makroskopische Membranstrom unmittelbar danach spontan und rapide zu, die Leitfähigkeit der Lipidmembran wächst innerhalb weniger Minuten um mehrere Größenordnungen an. Zu beachten ist, daß hier keine weiteren Anstöße wie die in Kap. 3.1.1.1 beschriebenen Spannungssprünge notwendig sind, um Änderungen in der Membranleitfähigkeit hervorzurufen.

Abb 3.3a macht deutlich, daß der Anstieg der Membranleitfähigkeit allein auf die Applikation des Kanalbildners und nicht auf Membraneffekte infolge des Absenkens des pH-Wertes zurückzuführen ist. Nach einer kurzen Verzögerungszeit nach der Zugabe von Phalloporin kommt es zu einem zunächst raschen Zuwachs des Membranstroms, der aber mit der Zeit langsamer wird und letztlich in eine stetige Drift übergeht. Ein stationärer Endwert wird innerhalb von 5-6 Stunden nicht erreicht. Die Membranleitfähigkeit ist nach 45 Minuten auf $3.3 \cdot 10^{-4} \text{ S/cm}^2$ angestiegen, was bei einem Einzelkanalleitwert des Phalloporins von 55 pS (Kap. 3.1.4.5) einer Kanaldichte von etwa $6 \cdot 10^6$ Kanälen/cm² entspricht (ca. 1 Kanal pro 10 µm²).

Der spontane Zuwachs der Membranleitfähigkeit bei niedrigem pH läßt sich außerdem wieder stoppen, wenn man den pH-Wert allein auf der cis-Seite

wieder basischer macht (Abb. 3.3b). Der Membranstrom verharret auf dem einmal erreichten Niveau, es werden keine weiteren Kanäle inkorporiert. Es fehlt auch die in Abb. 3.3a beobachtete Drift bei langen Beobachtungszeiten. Offensichtlich sind die einmal eingebauten Kanäle fest in der Membran verankert und werden nicht wieder ausgebaut, wenn das Medium basischer wird. Dies entspricht dem Verhalten der irreversibel eingebauten Phalloporinkanäle in Kap. 3.1.1.1.

Daß der Zuwachs der Membranleitfähigkeit allein auf die Inkorporation von einzelnen Kanälen zurückzuführen ist, läßt sich gut bei einer Einbaukurve erkennen, die mit einer höheren Stromauflösung aufgenommen wurde. Eine solche ist in Abb. 3.3c dargestellt. Man erkennt, daß der Membranstromzuwachs nach Applikation des Kanalbildners in Wirklichkeit nicht kontinuierlich, sondern in diskreten Stufen erfolgt. Diese Stufen repräsentieren die aufeinanderfolgenden Einbauprozesse einzelner Ionenkanäle. Diese Abbildung zeigt außerdem, daß alle diese Einbaustufen eine einheitliche Höhe haben. Das verdeutlicht, daß es sich tatsächlich nur um einen einzigen Kanaltypus handelt, der den makroskopischen Leitfähigkeitszuwachs in Lipidmembranen hervorruft. Weiterhin stimmen alle Eigenschaften dieser Ionenkanäle wie Spannungsabhängigkeit, Einzelkanalleitwert, pH-Abhängigkeit und gerichteter Einbau völlig mit den Daten des Phalloporins überein, die in Kap. 1.3.3.3 beschrieben wurden. Die Proteinpräparation aus *Amanita phalloides* enthält somit hauptsächlich nur eine Ionenkanalspezies, das Phalloporin, dessen Einbau in Lipidmembranen durch den pH-Wert gesteuert wird.

An dieser Stelle soll erwähnt werden, daß eine Reihe von Präparationen des Pilzes offensichtlich noch einen zweiten Kanalbildner enthalten, dessen Eigenschaften kurz in Kap. 3.1.4.6 dargestellt werden. Diese zweite Kanalspezies ist jedoch in sehr viel geringerem Maße aktiv als das Phalloporin. Bei niedrigen pH-Werten, bei denen sich das Phalloporin spontan inkorporiert, beträgt die Anzahl der eingebauten Ionenkanäle des zweiten Typs weit weniger als 1 Promille des Phalloporins. Sein Beitrag zur Gesamtleitfähigkeit der Membran ist daher vernachlässigbar klein.

Im Gegensatz zum spannungsinduzierten Einbau des Phalloporins bei neutralen und basischen pH-Werten ist der spontane Einbau im sauren Milieu nicht vom Vorzeichen der angelegten Membranspannung abhängig. Er erfolgt sowohl bei einer positiven als auch bei einer negativen Haltespannung (s. z.B. Abb. 3.19). Zu einem spontanen Einbau kommt es ferner auch, wenn keine Spannung an die Membran angelegt ist (nicht gezeigt).

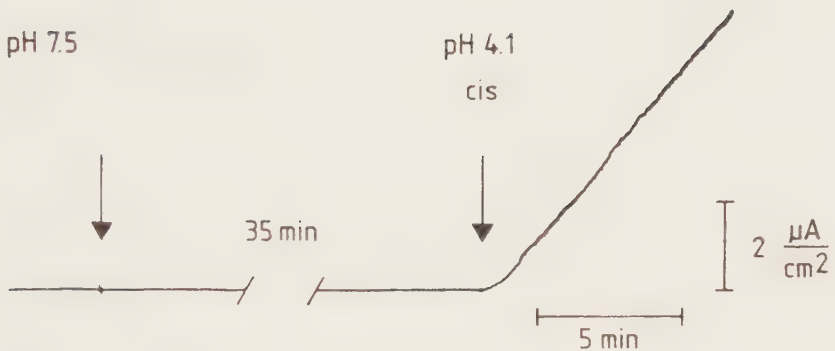


Abb. 3.2: Spontane Inkorporation von Phalloporin bei saurem pH. Zu Beginn des Experiments liegt auf beiden Seiten ein basischer pH-Wert (7.5) vor, die angelegte Spannung beträgt +50 mV. Die Leitfähigkeit der Membran ist niedrig ($10^{-8} S/cm^2$). Setzt man Phalloporin zu (1. Pfeil, Endkonzentration $0.28 \mu g$ Protein/ml), kommt es unter diesen Bedingungen wie im Kap. 3.1.1.1. beschrieben zu keiner Kanalaktivität. Der pH-Wert wurde anschließend nur auf der cis-Seite durch Zugabe einer entsprechenden Menge HCl auf 4.1 abgesenkt. Unmittelbar danach kam es zu einem kontinuierlichen Zuwachs des Membranstroms, der den Anstieg der Membranleitfähigkeit widerspiegelt. (Zunahme auf $1.4 \cdot 10^{-4} S/cm^2$ am Ende der Spur).

Experimentelle Bedingungen:

Elektrolytlösung: 1 M NaCl; 10 mM Tris-acetat, pH 7.5

Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPS; Cholesterol (7:2:1)

Membranfläche: $2.9 \cdot 10^{-4} cm^2$

a

pH 4.5



b

Tris
cis



Abb. 3.3a: Spontaner Einbau von Phalloporin bei niedrigem pH-Wert. Zu Beginn des Versuchs liegt auf beiden Membranseiten ein niedriger pH-Wert vor (4.5). Die Membranleitfähigkeit in Abwesenheit von Phalloporin ist gering ($\approx 10^{-8} \text{ S}/\text{cm}^2$). Nach Zugabe von Phalloporin (Pfeil, Endkonzentration $0.28 \mu\text{g Protein}/\text{ml}$) auf der cis-Seite kommt es nach einer kurzen Verzögerungszeit zu einem kontinuierlichen Anwachsen des Membranstroms. Nach 45 min ist die Membranleitfähigkeit auf $3.3 \cdot 10^{-4} \text{ S}/\text{cm}^2$ angewachsen, was bei einem Einzelkanalleitwert von 55 pS einer Kanaldichte von $6 \cdot 10^6$ Kanälen/ cm^2 entspricht.

Elektrolytlösung: 1 M NaCl; 10 mM Tris-acetat, pH 4.5
 Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPS; Cholesterol (7:2:1)
 Membranspannung: +50 mV

Abb. 3.3b: Der spontane Einbau von Phalloporin läßt sich wieder stoppen, wenn man den pH-Wert während der Zuwachphase des Membranstroms durch Zugabe einer entsprechenden Menge an Tris auf der cis-Seite wieder anhebt. Der Membranstrom nimmt nach ca. 2 min ein stabiles Niveau an.

Elektrolytlösung: 1 M NaCl; 20 mM Tris-acetat, pH 4.5
 ansonsten Versuchsbedingungen wie unter a.

C



Abb. 3.3c: Der Zuwachs des Membranstroms bzw. der Membranleitfähigkeit nach Zugabe von Phalloporin auf der cis-Seite der Membran bei einer höheren Stromaauflösung. Zu erkennen ist deutlich der stufenartige Zuwachs des Membranstroms, der die diskreten Einbauschritte einzelner Ionenkanäle widerspiegelt. Zu beachten ist, daß die Einzelkanalleitwerte (Stromamplituden) dieser Stufen einheitlich sind. Ferner stimmen alle Eigenschaften dieser Kanäle völlig mit den Daten des Phalloporins überein.

Experimentelle Bedingungen:

Elektrolytlösung: 1 M NaCl; 10 mM Tris-acetat, pH 4.75

Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPS; Cholesterol (7:2:1)

Membranspannung: +50 mV

Eine Lipidabhängigkeit des spontanen Einbaus in Membranen wurde nicht beobachtet. Dasselbe Verhalten zeigt sich, wenn in dem verwendeten Lipidgemisch das negativ geladene DOPS durch das neutrale Phosphatidyläthanolamin in demselben molaren Verhältnis ersetzt wird.

Um die Abhängigkeiten des spontanen Einbaus quantitativ zu erfassen, wurden mehrere Einbauparameter des Phalloporins festgelegt, die in Abb. 3.4a und 3.4b dargestellt sind:

a) Die Verzögerungszeit t_{lag} umfaßt den Zeitraum zwischen dem Moment der Zugabe des Kanalbildners und dem Auftreten des ersten Phalloporinkanals in der Membran. Dieser Zeitraum schließt somit alle Prozesse wie Verteilung und Diffusion der Moleküle in der wäßrigen Phase, Diffusion durch die angerührte Membran-Elektrolyt-Grenzschicht, Adsorption an den Bilayer sowie eventuelle weitere Aktivierungsschritte ein.

b) Der zweite wesentliche Parameter, der eine Einbaukurve beschreibt, ist die maximale Steigung der Stromzuwachskurve $(\Delta I/\Delta t)_{max}$. Aus ihr läßt sich mit dem bekannten Wert des Einzelkanalstroms I_k die maximale Zuwachsrate an Phalloporinkanälen $(\Delta N/\Delta t)_{max}$ nach der Beziehung

$$\left(\frac{\Delta N}{\Delta t}\right)_{max} = \left(\frac{I}{I_k \cdot \Delta t}\right)_{max} \quad (G1. 3.1)$$

berechnen. Voraussetzung hierfür ist, daß die Kanäle bei dem betrachteten pH-Wert praktisch immer offen sind ($p_o \approx 1$).

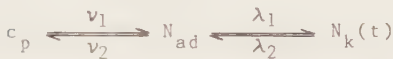
c) Weiterhin ist kennzeichnend, welcher Membranstromwert lange Zeit nach Beginn der Leitfähigkeitserhöhung erreicht wurde. Da die Einbaukurven des Phalloporins keinen stationären Endwert erreichen, wurde als Bezugswert der nach 45 Minuten erreichte Stromwert I_{45} gewählt ($t - t_{lag} = 45$ min). Da sich die Phalloporinkanäle bei sauren pH-Werten praktisch nur im geöffneten Zustand befinden ($p_o \approx 1$; s.o.), kann der Membranstrom als ein mittelbares Maß für die Anzahl der eingebauten Kanäle angesehen werden. Daher läßt sich die Anzahl N_{45} der nach 45 Minuten eingebauten Kanäle mit Hilfe des bekannten Einzelkanalstromes I_k nach der einfachen Beziehung

$$N_{45} = \frac{I_{45}}{I_k} \quad (G1. 3.2)$$

berechnen.

3.1.1.2.1 Nähere kinetische Betrachtungen

Die in Abb. 3.4a dargestellte charakteristische Phalloporineinbaukurve mit ihrem S-förmigen Verlauf läßt darauf schließen, daß dem Einbauprozess ein sequentielles Reaktionsschema zugrunde liegt. Man nimmt dabei an, daß das Phalloporin beim Übergang von der Wasserphase zum fluktuierenden Kanal einen adsorbierten Zwischenzustand durchlaufen muß, in dem das Molekül zunächst an der Wasser-Lipid-Grenzfläche verharret (s. Anhang, Kap. 6.1). Das Reaktionsschema einer solchen Konsekutivreaktion lautet im einfachsten Fall (Gl. 6.1):



c_p ist die Konzentration an freiem Phalloporin in der Wasserphase, N_{ad} die Anzahl der Moleküle im adsorbierten Zwischenzustand und $N_k(t)$ die Anzahl der fluktuierenden Kanäle in der Membran. $v_{1,2}$ und $\lambda_{1,2}$ sind die Geschwindigkeitskonstanten dieser Reaktionen. Im Experiment ist allein $N_k(t)$ direkt bestimmbar.

Ist N_∞ die Anzahl der fluktuierenden Kanäle in der Membran zu einem Zeitpunkt, der weit entfernt vom Beginn der Einbaureaktion ist, gilt (Gl. 6.9):

$$\frac{N_\infty - N_k(t)}{N_\infty} = B \cdot e^{-\lambda_2 t} + A \cdot e^{-\lambda_1 t}$$

A und B sind Konstanten.

In einer halblogarithmischen Darstellung von $(N_\infty - N_k(t))/N_\infty$ lassen sich die beiden Exponentialfunktionen getrennt darstellen. Die Steigungen der Anpassungsgeraden sind gegeben durch $-\lambda_1$ bzw. $-\lambda_2$ (Abb. 3.4b). Eine Betrachtung der Konzentrationsabhängigkeiten der Einbauparameter (Kap. 3.1.1.3) läßt Rückschlüsse auf die Gültigkeit des oben vorgeschlagenen dreistufigen Reaktionsschemas zu. Als Folgerung ergibt sich aus diesem sequentiellen Reaktionsmodell, daß der Einbauparameter $(\Delta N/\Delta t)_{\max}$ direkt proportional zu der Konzentration c_p des Phalloporins in der Wasserphase sein muß (s. Kap. 6.1, Gl. 6.12):

$$(\Delta N/\Delta t)_{\max} \sim c_p$$

Ferner läßt sich zeigen, daß die Konzentrationsabhängigkeit von N_∞ mit den

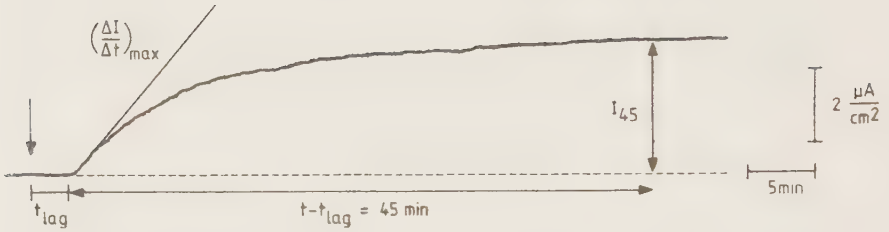


Abb. 3.4a: Zur quantitativen Beschreibung des spontanen Einbaus anhand der Phalloporineinbaukurven werden 3 Einbauparameter festgelegt:

a) die Verzögerungszeit t_{lag} zwischen dem Moment der Zugabe und dem Auftreten der ersten Kanalaktivität, b) die maximale Zuwachsrate des Membranstroms $(\Delta I/\Delta t)_{\text{max}}$, c) der Membranstromwert I_{45} , der jeweils 45 min nach Beginn des Leitfähigkeitszuwachses erreicht wird.

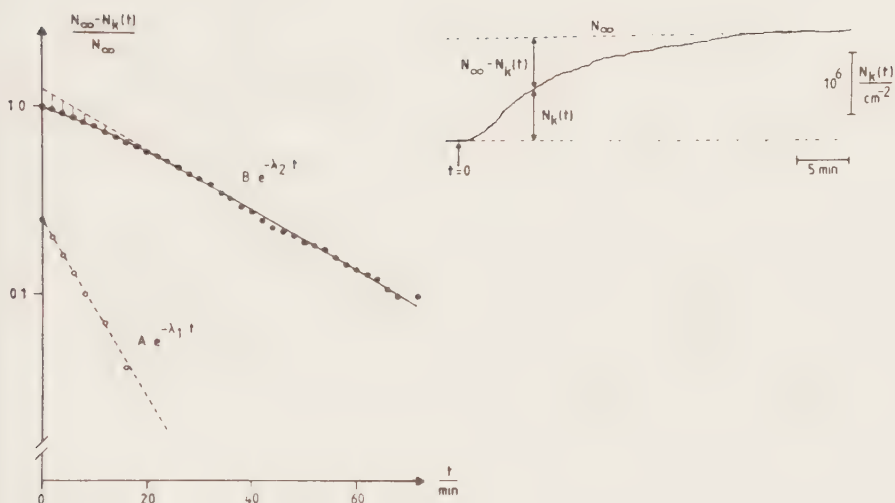


Abb. 3.4b: Ein sequentielles Reaktionsschema in Form von Gl. 6.1 ermöglicht die mathematische Beschreibung der Bildung von Phalloporinkanälen als Differenz zweier Exponentialfunktionen (s. Kap. 6.1, Gl. 6.9). Oben rechts ist die Originalaufzeichnung einer Phalloporineinbaukurve dargestellt. $N_k(t)$ ist direkt an der Einbaukurve ablesbar, der Wert für N_∞ läßt sich näherungsweise durch das Anlegen einer Tangente an den Endteil der Kurve bestimmen (obere gestrichelte Linie). Die untere gestrichelte Linie zeigt die Fortführung der Nulllinie an, $t = 0$ markiert den Start des Einbauvorgangs. Links ist eine halblogarithmische Darstellung der aus einer Einbaukurve ermittelten Werte für $N_\infty - N_k(t)/N_\infty$ gegeben (ausgefüllte Punkte). Der Endteil der Kurve kann gut durch eine Exponentialfunktion mit der Geschwindigkeitskonstanten λ_2 angepaßt werden (Anpassungsgerade). Durch eine Differenzbildung zwischen der extrapolierten exponentiellen (gestrichelte Linie) und der experimentellen Kurve läßt sich im Anfangsteil die zweite Exponentialfunktion mit der Geschwindigkeitskonstanten λ_1 darstellen (offene Kreise unten). Die Geschwindigkeitskonstanten lassen sich jeweils aus den Geradensteigungen ermitteln, in diesem Beispiel $\lambda_1 = 1.1 \cdot 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ und $\lambda_2 = 3.6 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$. Der Einbauprozess von Phalloporin umfaßt somit eine schnelle (λ_1) und eine langsame (λ_2) Komponente, die jeweils den Anfangs- und Endteil der Kurve beschreiben.

Konzentrationsabhängigkeiten der Parameter $(\Delta N/\Delta t)_{\max}$ und λ_2 verknüpft ist. Setzt man der Übersichtlichkeit halber

$$(\Delta N/\Delta t)_{\max} = \mu$$

und stellt man die genannten Größen als Funktionen der Phalloporinkonzentration c_p dar, so folgt (Gl. 6.10):

$$N_{\infty}(c_p) = \frac{\mu(c_p)}{\lambda_2(c_p)}$$

Die Größe N_{∞} kann in der Praxis nicht exakt bestimmt werden, da die Phalloporineinbaukurven keinen echten stationären Endwert erreichen (s. Abb. 3.4a). Man behilft sich, indem man die Kanalanzahl zu einem Zeitpunkt bestimmt, der zeitlich weit entfernt von dem Beginn des Einbauprozesses ist. Vereinbarungsgemäß wurde dazu die Anzahl N_{45} festgelegt (Gl. 3.2). Näherungsweise sollte daher gelten (Gl. 6.11):

$$N_{45}(c_p) = \frac{\mu(c_p)}{\lambda_2(c_p)}$$

Alle drei Größen der Gl. 6.11 sind experimentell unabhängig voneinander bestimmbar und somit auch ihre Konzentrationsabhängigkeiten. Beschreibt das vorgeschlagene sequentielle Reaktionsschema den Einbauprozess des Phalloporins hinreichend gut, so sollten die experimentell bestimmten Konzentrationsabhängigkeiten der Parameter N_{45} , μ und λ_2 die Bedingung der Gl. 6.11 erfüllen.

3.1.1.2.2 Die pH-Abhängigkeit der Verzögerungszeit t_{lag}

Die Abb. 3.5 zeigt, daß die Verzögerungszeit t_{lag} zu niedrigen pH-Werten ($\text{pH} < 5$) hin einen Minimalwert erreicht. Dieser liegt bei etwa 2 min. Sobald das Milieu alkalischer wird ($\text{pH} > 5.5$), erfordert es im Mittel eine längere Zeit, bis der erste Kanal erscheint. Bei pH 6.4 beträgt die Verzögerungszeit bereits mehr als das 10fache des Minimalwertes. Bei pH 7 wurde kein spontaner Kanaleinbau über mehrere Stunden hin beobachtet (Kap. 3.1.1.1).

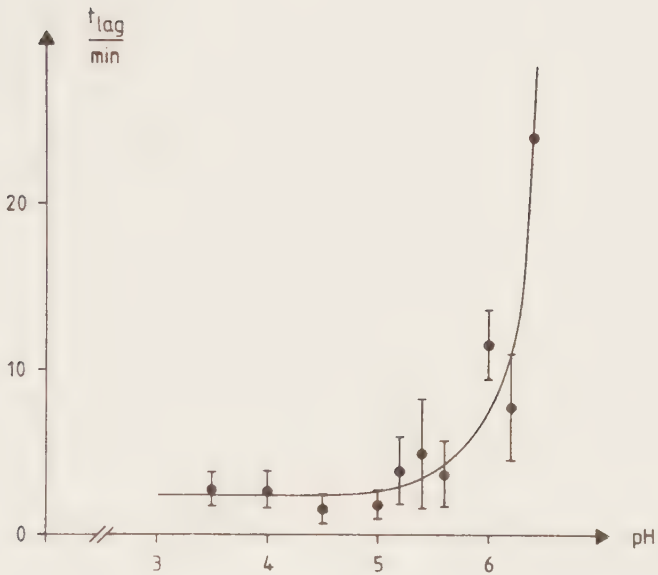


Abb. 3.5: Die Verzögerungszeit t_{lag} in Abhängigkeit vom pH-Wert.
Elektrolytlösung: 1 M NaCl; 10 mM Tris-acetat
Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPS; Cholesterol (7:2:1)
Membranspannung: -50 mV
Proteinkonzentration: 0.28 $\mu\text{g/ml}$ (cis)

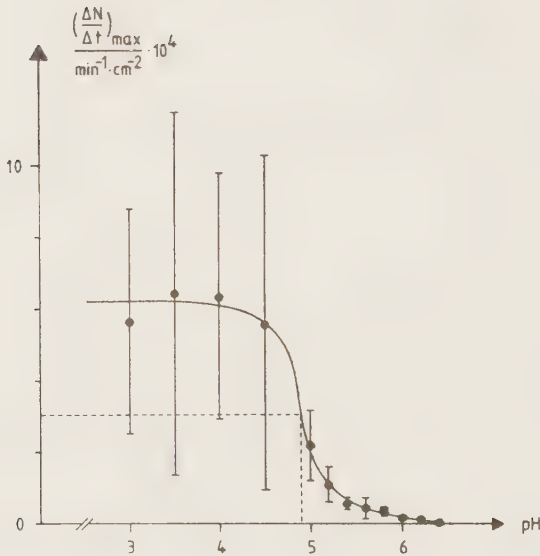


Abb. 3.6: Die maximale Einbaurrate $(\Delta N/\Delta t)_{\max}$ in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die Werte wurden auf die Membranfläche normiert. Im pH-Bereich 3-4 wird ein Sättigungswert erreicht, der $6.1 \cdot 10^5$ Kanäle/cm² min beträgt. Dieser wurde als arithmetisches Mittel der Meßdaten bei den pH-Werten 3.0, 3.5 und 4.0 berechnet. Die gestrichelten Linien zeigen den halbmaximalen Wert und den zugehörigen pH-Wert an. Dieser liegt bei 4.9. Die angelegte Membranspannung beträgt +50 mV. Ansonsten sind die Versuchsbedingungen identisch mit denen in Abb. 3.5.

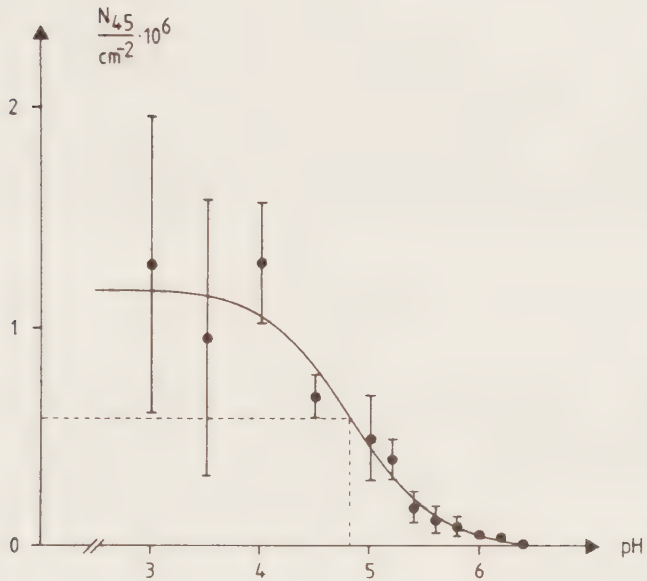


Abb. 3.7: Die Anzahl N_{45} der eingebauten Phalloporinkanäle nach jeweils 45 Minuten. Die Werte wurden auf die Membranfläche normiert. Der Sättigungswert N_{sat} im pH-Bereich 3-4 beträgt $1.2 \cdot 10^6$ Kanäle/ cm^2 . Dieser wurde als arithmetisches Mittel der Meßpunkte bei den pH-Werten 3.0, 3.5 und 4.0 berechnet. Die gestrichelten Linien zeigen den halbmaximalen Wert und den zugehörigen pH-Wert an. Dieser liegt bei 4.8. Die angelegte Membranspannung beträgt +50 mV. Ansonsten sind die Versuchsbedingungen identisch mit denen in Abb. 3.5.

3.1.1.2.3 Die pH-Abhängigkeit der maximalen Einbaurrate $(\Delta N/\Delta t)_{\max}$

Die Abb. 3.6 zeigt die maximale Zuwachsrate an Phalloporinkanälen in Abhängigkeit vom pH-Wert der Elektrolytlösung. Die Werte wurden auf die Membranfläche normiert. Ausgehend von pH 6.4 nimmt $(\Delta N/\Delta t)_{\max}$ zu sauren pH-Werten hin S-förmig zu und erreicht im pH-Bereich von 3-4 einen Sättigungswert. Die Einbaukurven haben hier ihre größte Maximalsteigung $(\Delta N/\Delta t)_{\max}$. Der halbmaximale Wert wird bei pH 4,9 erreicht (pK-Wert). Die Abb. 3.6 stellt somit eine Titrationskurve dieses Einbauparameters dar.

3.1.1.2.4. Die pH-Abhängigkeit von N_{45}

In Abb. 3.7 ist die Anzahl der Phalloporinkanäle, die jeweils nach 45 Minuten in die Membran eingebaut waren, in Abhängigkeit vom pH-Wert der Elektrolytlösung aufgetragen. Die Werte wurden auch hier auf die Membranfläche normiert. Es ergibt sich ein entsprechendes Bild wie in Abb. 3.6. Die Kanalzahl nimmt ausgehend von etwa pH 6.4 zu sauren pH-Werten hin S-förmig zu und erreicht gleichfalls im pH-Bereich von 3-4 einen Sättigungswert. Wie im Fall der maximalen Inkorporationsrate (s.o.) erhält man für den Parameter N_{45} eine Titrationskurve, deren halbmaximaler Wert bei pH 4.8 erreicht wird (pK-Wert).

Für die Parameter N_{45} , $(\Delta N/\Delta t)_{\max}$ und t_{lag} ändert sich die Lage ihrer Kurven entlang der pH-Achse praktisch nicht, wenn bei der gleichen Spannung, aber entgegengesetztem Vorzeichen (-50 mV) gemessen wird. Die Abweichungen in den pK-Werten sind gering und liegen im Bereich der experimentellen Streuung.

3.1.1.2.5 Henderson-Hasselbalch-Darstellung des Phalloporineinbaus

Die gezeigte pH-Abhängigkeit der drei Einbauparameter legt den Schluß nahe, daß eine Protonierungsreaktion den spontanen Einbau des Phalloporins beeinflusst. Offensichtlich kann das Phalloporin in zwei Formen vorliegen, einer unprotonierten Form P^- und einer protonierten Form HP. Das Minuszeichen soll dabei andeuten, daß die unprotonierte Form gegenüber der protonierten Form mindestens eine negative Nettoladung mehr besitzt. Über die wahren Ladungsverhältnisse des Phalloporins ist jedoch nichts bekannt. Nur die protonierte Form HP ist in der Lage, sich spontan in Lipidmembranen

zu inkorporieren. Demnach läßt sich bei neutralen und basischen pH-Werten kein spontaner Einbau beobachten (Kap. 3.1.1.1), weil die Protonenkonzentration in der wäßrigen Phase sehr niedrig ist und das Phalloporin ausschließlich in seiner unprotonierten, sich nicht spontan einbauenden Form vorliegt. Das Vorhandensein einer titrierbaren Gruppe am Kanal, die über Einbau bzw. Nichteinbau entscheidet, führt dann zu den Titrationskurven der Einbauparameter $(\Delta N/\Delta t)_{\max}$ und N_{45} (Abb. 3.6 und 3.7) sowie zu der Verlängerung der Verzögerungszeit t_{lag} in Richtung zu alkalischen pH-Werten (Abb. 3.5).

In dem pH-Bereich, in dem die Sättigungswerte erreicht werden (pH 3-4), liegt das Phalloporin ausschließlich in der protonierten Form vor.

Eine solche Titrationskurve läßt sich leicht in die Form einer Henderson-Hasselbalch-Beziehung überführen. Diese Auftragung ist vorteilhaft, da sie die Bestimmung der Anzahl n der geladenen Gruppen am Kanal ermöglicht, die an der Protonierungsreaktion beteiligt sind (s. Anhang, Kap. 6.2, Gl. 6.21). Im einfachsten Fall einer protonierbaren Gruppe ($n = 1$) lautet dann die Henderson-Hasselbach-Gleichung (Gl. 6.24):

$$\lg \frac{[P^-]}{[HP]} = \text{pH} - \text{pK}$$

Dabei ist pK der pK -Wert der protonierten Gruppe am Kanal. Für den Einbauparameter N_{45} ergibt sich das Konzentrationsverhältnis $[P^-]/[HP]$ als:

$$\frac{[P^-]}{[HP]} = \frac{N_{\text{sat}} - N_{45}}{N_{45}} \quad (\text{Gl. 3.3})$$

wobei N_{45} der Sättigungswert der Titrationskurve im pH-Bereich 3-4 ist. Ist nur ein Proton an der Reaktion beteiligt ($n = 1$), so erwartet man bei der Auftragung von $\lg [P^-]/[HP]$ gegen den pH-Wert eine lineare Beziehung mit der Steigung 1, bei Beteiligung von 2 Protonen eine Steigung von 2 usw. (s. Kap. 6.2).

Diese Auftragung ist in Abb. 3.8a dargestellt. Die lineare Regression liefert für die experimentellen Werte eine Gerade mit der Steigung 1.01, also nahe bei 1. Gemäß Gl. 6.24 ergibt sich der pK -Wert der protonierten Gruppe als Schnittpunkt mit der pH-Achse. Dieser liegt bei 4.8.

Die Abb. 3.8b zeigt in einer entsprechenden Form die Daten für den Einbauparameter $(\Delta N/\Delta t)_{\max}$. Die lineare Regression liefert in diesem Fall eine Gerade mit der Steigung 1.68, der pK -Wert, bestimmt als Schnittpunkt mit der

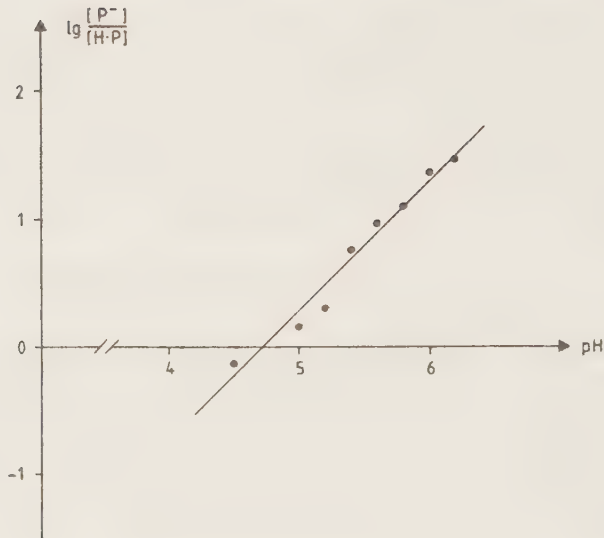


Abb. 3.8a: Das Konzentrationsverhältnis zwischen der protonierten und der unprotonierten Form HP bzw. P^- des Phalloporins in Abhängigkeit vom pH-Wert gemäß einer Henderson-Hasselbalch-Gleichung (s. Text). Das Mengenverhältnis wurde aus der Titrationskurve des Parameters N_{45} bestimmt (Abb. 3.7). Als Sättigungswert N_{sat} wurde das arithmetische Mittel der Meßdaten bei den pH-Werten 3.0, 3.5 und 4.0 zugrunde gelegt. Die Beziehung läßt sich im pH-Bereich zwischen 4.5 und 6.2 gut mit einer linearen Beziehung beschreiben, der pH-6.4-Wert wurde wegen des kleinen und nur ungenau bestimmbar Verhältnisses von $[HP]/[P^-]$ in dieser Auftragung fortgelassen. Eine lineare Regression liefert eine Gerade mit der Steigung 1.01, der Korrelationskoeffizient beträgt 0.98. Der pK-Wert ergibt sich als Schnittpunkt mit der pH-Achse und liegt bei 4.8.

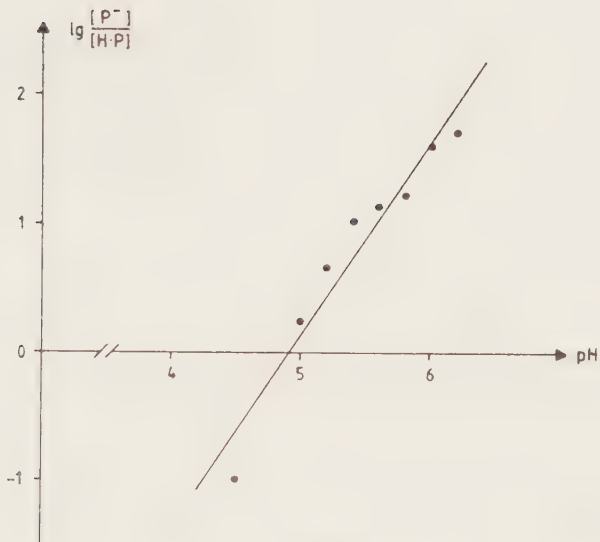


Abb. 3.8b: Die Titrationskurve des Parameters $(\Delta N/\Delta t)_{\max}$, dargestellt nach der Henderson-Hasselbalch-Beziehung. Das Mengenverhältnis zwischen der protonierten und unprotonierten Form HP und P^- wurde aus der Titrationskurve in Abb. 3.6 bestimmt. Als Sättigungswert wurde das arithmetische Mittel der Meßdaten bei den pH-Werten 3.0, 3.5 und 4.0 zugrunde gelegt. Der pH-6.4-Wert wurde wegen des kleinen und nur ungenau bestimmbar Verhältnisses von $[HP]/[P^-]$ in dieser Auftragung fortgelassen. Eingezeichnet ist eine Regressionsgerade mit einer Steigung von 1.68 und einem Korrelationskoeffizienten von 0.97. Der Schnittpunkt mit der pH-Achse (pK-Wert) liegt bei 4.9.

pH-Achse, beträgt 4.9.

Berücksichtigt werden muß dabei in jedem Falle die starke Streuung der Datenpunkte in den Abbildungen 3.6 und 3.7, die diesen Henderson-Hasselbalch-Darstellungen zugrunde liegen. Diese Art der Auftragung soll aber genügen, um einen Näherungswert für die Anzahl der bei dem Einbauprozess beteiligten Protonen anzugeben. Demnach sind 1-2 H^+ -Ionen und entsprechend 1-2 protonierbare Gruppen am Kanal an der Einbaureaktion beteiligt; ihre pK -Werte, bestimmt als Schnittpunkte mit der pH-Achse, liegen im Bereich 4.8-4.9.

3.1.1.3 Die Konzentrationsabhängigkeit der Einbauparameter

Neben der pH-Abhängigkeit ist die Abhängigkeit der Einbauparameter von der eingesetzten Phalloporinkonzentration von Bedeutung. Diese kann Aufschluß sowohl über den Einbauprozess in die Membran als auch über die Form des Kanalkomplexes in der Membran geben. Untersucht wurden wiederum die drei Einbauparameter t_{lag} , N_{45} und $(\Delta N/\Delta t)_{max}$ sowie die Geschwindigkeitskonstanten λ_1 und λ_2 des Phalloporinkanaleinbaus (Kap.3.1.1.2.1).

3.1.1.3.1 Die Konzentrationsabhängigkeit der Verzögerungszeit t_{lag}

Abb. 3.9 zeigt die Verzögerungszeit t_{lag} in Abhängigkeit von der eingesetzten Phalloporinkonzentration in doppeltlogarithmischer Auftragung. Je höher die eingesetzte Phalloporinkonzentration ist, desto kürzer wird die Verzögerungszeit. Die Werte lassen sich gut durch eine Gerade anpassen, deren Steigung -0.35 beträgt.

3.1.1.3.2 Die Konzentrationsabhängigkeit von N_{45}

Abb. 3.10 zeigt den Einbauparameter N_{45} in Abhängigkeit von der Phalloporinkonzentration in der wässrigen Phase. Je höher die eingesetzte Konzentration ist, desto größer ist die Anzahl der Kanäle, die sich jeweils nach 45 Minuten inkorporiert haben. Die Steigung der Anpassungsgeraden beträgt 0.63.

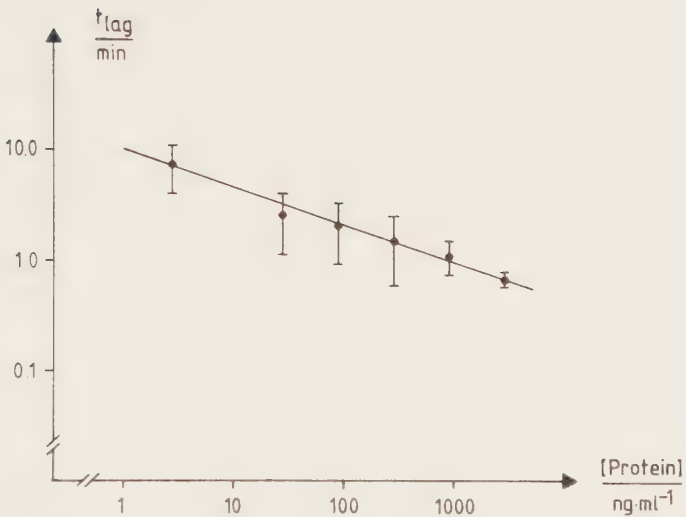


Abb. 3.9: Die Verzögerungszeit t_{lag} in Abhängigkeit von der eingesetzten Phalloporinkonzentration in der wäßrigen Phase auf der cis-Seite in doppeltlogarithmischer Auftragung. Die Verzögerungszeit nimmt mit steigender Phalloporinkonzentration ab. Die Meßpunkte wurden mit einer Geraden angepaßt, deren Steigung -0.35 beträgt.

Experimentelle Bedingungen:

Elektrolytlösung: 1 M NaCl; 10 mM Tris-acetat, pH 4.5

Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPS; Cholesterol (7:2:1)

Membranspannung: +50 mV

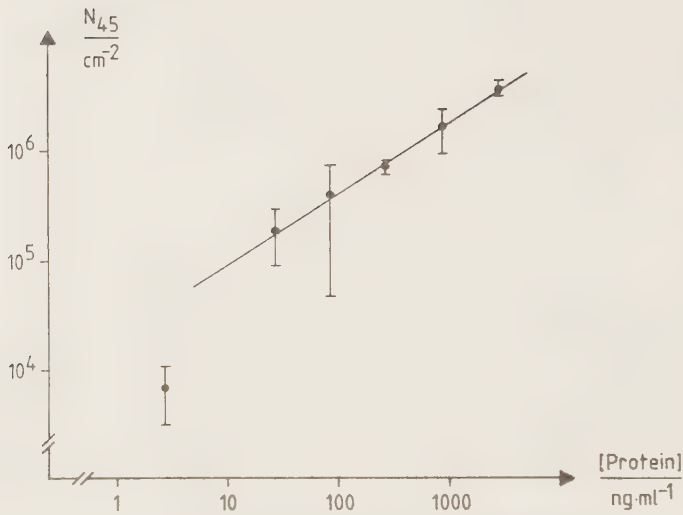


Abb. 3.10: Der Einbauparameter N_{45} in Abhängigkeit von der eingesetzten Phalloporinkonzentration in der wäßrigen Phase auf der cis-Seite in einer doppeltlogarithmischen Auftragung. N_{45} nimmt mit steigender Phalloporinkonzentration zu. Die Meßpunkte wurden für Konzentrationen >10 ng Protein/ml durch eine Gerade angepaßt, deren Steigung 0.63 beträgt. Experimentelle Bedingungen s. Abb. 3.9.

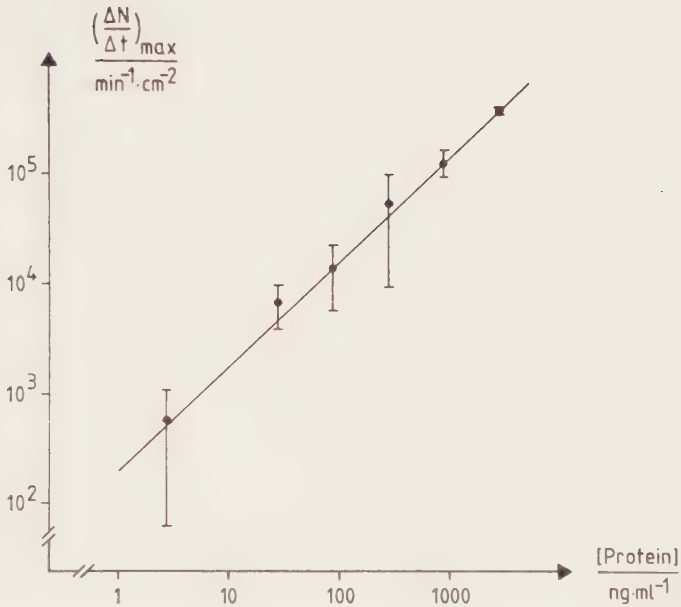


Abb. 3.11: Die maximale Einbaurate $(\Delta N / \Delta t)_{\max}$ in Abhängigkeit von der eingesetzten Phalloporinkonzentration in der wässrigen Phase auf der cis-Seite. Die Steigung der Anpassungsgeraden beträgt 0.96. $(\Delta N / \Delta t)_{\max}$ nimmt somit in guter Näherung linear mit der Phalloporinkonzentration zu. Experimentelle Bedingungen s. Abb. 3.9.

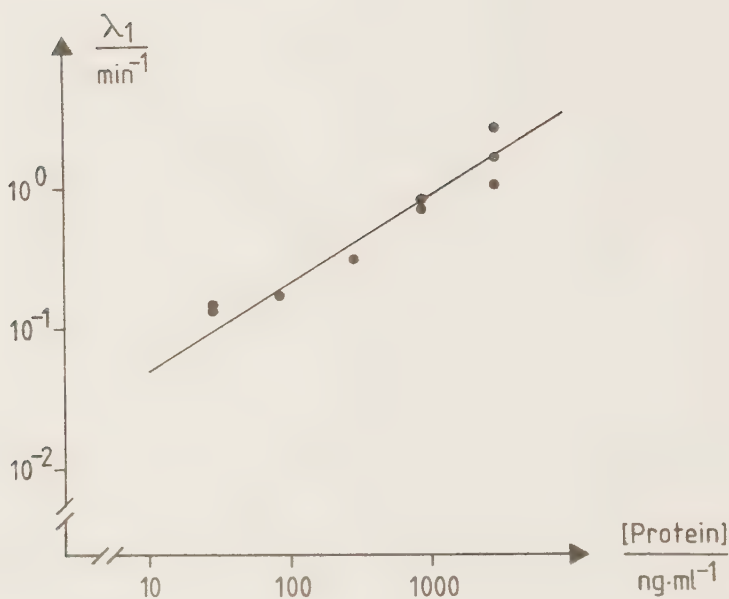


Abb. 3.12a: Die Geschwindigkeitskonstante λ_1 des Einbauprozesses von Phalloporin in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration in der wäßrigen Phase auf der cis-Seite (doppeltlogarithmische Auftragung). Die Steigung der Anpassungsgeraden beträgt 0.61. Die Werte für λ_1 wurden, wie in Abb. 3.4 dargestellt, als Steigung der Exponentialfunktion in einer halblogarithmischen Darstellung ermittelt. Man erhält diese e-Funktion durch Differenzbildung zwischen der experimentellen Kurve und der extrapolierten Anpassungsgeraden im Anfangsteil (Abb. 3.4b). Eingezeichnet sind die ermittelten λ_1 -Werte aus einzelnen Phalloporineinbaukurven, in denen ein Endwert N_∞ durch das Anlegen einer Tangente an den Kurvenendteil näherungsweise bestimmt werden konnte. Experimentelle Bedingungen s. Abb. 3.9.

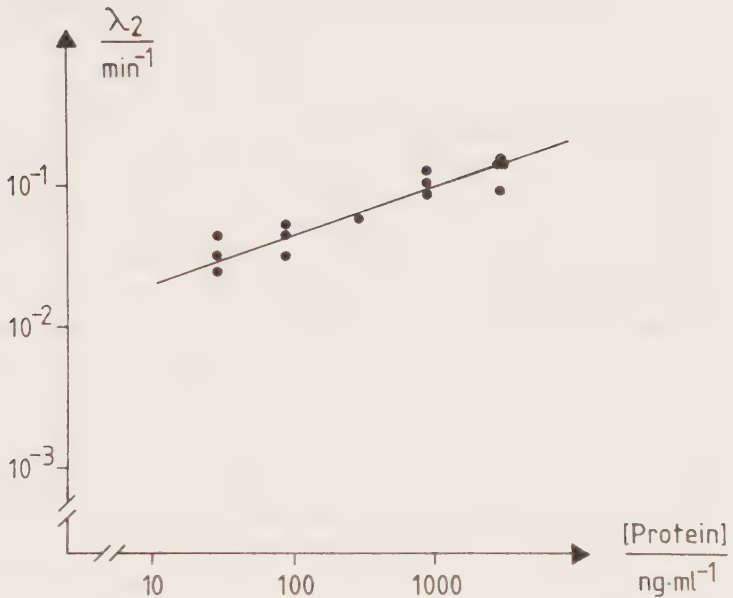


Abb. 3.12b: Die Geschwindigkeitskonstante λ_2 des Einbauprozesses von Phalloporin in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration auf der cis-Seite (doppeltlogarithmische Auftragung). Die Steigung der Anpassungsgeraden beträgt 0.34. Die Werte wurden, wie in Abb. 3.4b dargestellt, als Steigung der Exponentialfunktion in einer halblogarithmischen Darstellung ermittelt. Man erhält diese e-Funktion durch Anpassung der experimentellen Datenpunkte im Endteil der Kurve (Abb. 3.4b). Eingetragen sind die ermittelten λ_2 -Werte aus einzelnen Phalloporineinbaukurven, in denen man einen Endwert N_∞ durch das Anlegen einer Tangente an den Endteil der Einbaukurve näherungsweise bestimmen konnte. Experimentelle Bedingungen s. Abb. 3.9.

3.1.1.3.3 Die Konzentrationsabhängigkeit der maximalen Einbaurates ($\Delta N/\Delta t$)_{max}

Die Abb. 3.11 zeigt die doppeltlogarithmische Auftragung der maximalen Einbaurates ($\Delta N/\Delta t$)_{max} gegen die Phalloporinkonzentration. Die Steigung der Anpassungsgeraden beträgt 0,96, d.h. die maximale Einbaurates nimmt mit guter Näherung linear mit der eingesetzten Phalloporinkonzentration zu. In einer theoretischen Betrachtung des Phalloporineinbaus (Kap. 3.1.1.2.1 und Anhang 6.1) war eine direkte Proportionalität zwischen ($\Delta N/\Delta t$)_{max} und der Phalloporinkonzentration gefordert worden. Die experimentellen Daten erfüllen diese Bedingung somit hinreichend gut.

3.1.1.3.4 Die Konzentrationsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten λ_1 und λ_2

In Kap. 3.1.1.2.1 war ein dreistufiges sequentielles Reaktionsschema vorgeschlagen worden, das den Phalloporineinbauprozess durch zwei Exponentialfunktionen beschreibt (s. auch Anhang, Kap. 6.1, Gl. 6.9). Diese beiden Exponentialfunktionen können in einer entsprechenden Auftragung (Abb. 3.4b) getrennt dargestellt werden. Dies ermöglicht die Bestimmung der beiden Geschwindigkeitskonstanten λ_1 und λ_2 der Hin- und Rückreaktion vom adsorbierten zum kanalbildenden Zustand des Phalloporins. In den Abb. 3.12a und 3.12b sind λ_1 und λ_2 in Abhängigkeit von der eingesetzten Phalloporinkonzentration aufgetragen. Eine doppeltlogarithmische Auftragung liefert für die Konzentrationsabhängigkeit von λ_1 einen Exponenten von 0,61 und für die Konzentrationsabhängigkeit von λ_2 einen Exponenten von 0,34. Die Werte dieser Exponenten lassen sich als die Geradensteigungen in den doppeltlogarithmischen Auftragungen bestimmen.

3.1.2 Die elektrischen Eigenschaften phalloporinhaltiger Membranen (Perfusionsexperimente)

Die Steuerung des Phalloporineinbaus durch Wahl des pH-Wertes bietet im Vergleich zum spannungsinduzierten Einbau (Kap. 3.1.1.1) eine gute Methode, um Lipidmembranen mit einer Vielzahl von Kanälen dieser Spezies herzustellen und deren elektrischen Eigenschaften zu untersuchen. Sofern eine ausreichende Anzahl an Phalloporinkanälen inkorporiert ist, sollten die

makroskopischen elektrischen Membraneigenschaften wie Membranleitfähigkeit und -strom nur noch von diesen Kanälen bestimmt werden, während der Beitrag der reinen Lipidmembran vernachlässigbar gering ist. Membraneigenschaften können dann analog dem Voltage-clamp-Verfahren gemessen werden. Ein Nachteil ist, daß der Einbau des Phalloporins keinen Steady-state-Zustand erreicht, sondern die Membranleitfähigkeit auch nach langer Zeit noch einen stetigen, wenn auch prozentual geringen Zuwachs erfährt (Abb. 3.3a). Eine Messung wäre unter diesen Umständen ungenau, da die Membranleitfähigkeit mit der Zeit laufend zunimmt. Deshalb wurde ein Perfusionsverfahren benutzt, das in Kap. 2.2.2.3 beschrieben wurde. Dabei wird zunächst eine ausreichende Anzahl an Phalloporinkanälen bei einem niedrigen pH-Wert auf der cis-Seite (pH 4.0-4.5) in die Membran eingebaut. Bei diesem pH-Wert erfolgt der Einbau spontan. Das Perfusionsverfahren erlaubt es, durch Austausch der Elektrolytlösung auf der cis-Seite der Membran den Kanalbildner aus der wäßrigen Phase zu entfernen und dadurch den weiteren Kanaleinbau zu stoppen. Außerdem kann man durch den Lösungsaustausch den pH-Wert nun auf jeden gewünschten Wert einstellen. Abb. 3.13 zeigt, daß der Membranstrom, und somit auch die Anzahl der Kanäle, in der Membran nach einer Perfusion konstant bleibt. Die Entfernung des Phalloporins aus der wäßrigen Phase auf der cis-Seite stoppt den weiteren Zuwachs der Membranleitfähigkeit, die elektrischen Membraneigenschaften sind nun zeitlich konstant. Es findet also auch kein Ausbau der Kanäle statt. Dies ist bedeutsam, da ein Gleichgewicht stets durch gleiche Einbau- und Ausbauraten charakterisiert ist.

Bei der verwendeten Perfusionsmethode muß außerdem sichergestellt sein, daß sich die Anzahl der bei einem niedrigen pH-Wert eingebauten Kanäle nicht ändert, wenn der pH-Wert variiert wird. Es wäre z.B. denkbar, daß es bei basischen pH-Werten zu einem spontanen Wiederausbau kommt. Die Abb. 3.14 zeigt aber, daß sich die Anzahl der eingebauten Phalloporinkanäle nicht ändert, wenn der pH-Wert zwischenzeitlich erhöht wird. Zunächst wird Phalloporin bei einem niedrigen pH-Wert in die Lipidmembran inkorporiert. Der jeweilige Wert des Membranstroms reflektiert dabei die Anzahl der eingebauten Phalloporinkanäle. Da diese bei niedrigen pH-Werten praktisch nur geöffnet sind, läßt sich die Anzahl N der Kanäle leicht nach der Beziehung $N = I/I_k$ berechnen, wobei I_k der bekannte Einzelkanalstrom ist. Anschließend wird der pH-Wert zunächst nur auf der trans-Seite angehoben. Der Zuwachs des Membranstroms verläuft ungehindert weiter, da nur der pH-

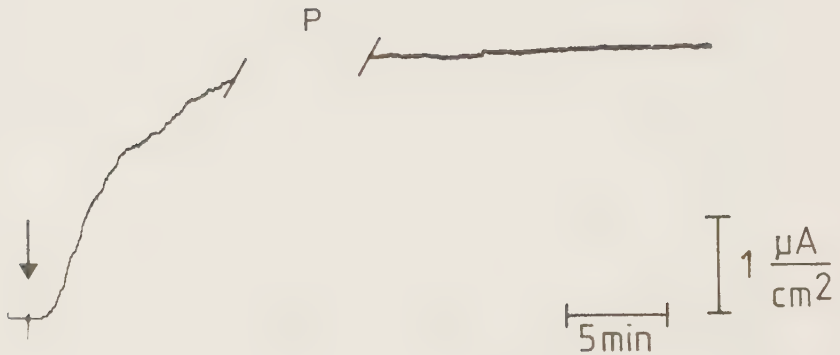


Abb. 3.13: Das Stoppen des Einbauprozesses bei pH 4.0 durch Perfusion. Zu Beginn erfolgt ein spontaner Einbau von Phalloporin bei einem pH-Wert von 4.0. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Phalloporinapplikation. Etwa 10 min nach Beginn des Einbaus haben sich ca. 350 Phalloporinkanäle in die Membran eingebaut. Das cis-Kompartiment wird mit der gleichen Elektrolytlösung perfundiert (P), um das freie Phalloporin zu entfernen. Die Dauer des Perfusionsvorgangs beträgt ca. 7 min, die Membranspannung bleibt während dieser Zeit unverändert angelegt. Nach der Perfusion bleibt der Membranstrom konstant auf einem Niveau.

Experimentelle Bedingungen:

Elektrolytlösung: 1 M NaCl; 10 mM Tris-acetat, pH 4.0 vor und nach der Perfusion

Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPS; Cholesterol (7:2:1)

Membranspannung: +50 mV

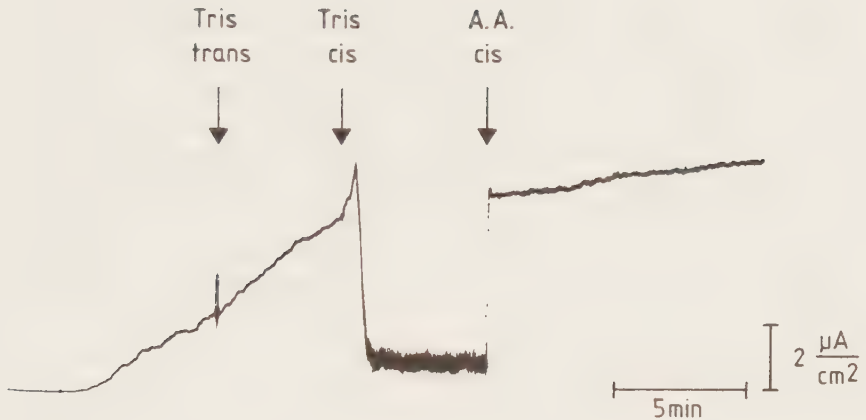


Abb. 3.14: Das Verhalten der Anzahl eingebauter Phalloporinkanäle bei Anheben des pH-Wertes. Zu Beginn des Experiments herrscht auf beiden Seiten der Membran ein pH-Wert von 4.0. Nach Zugabe des Phalloporins kommt es zu einem Anstieg des Membranstroms. Zunächst wird durch Zugabe einer entsprechenden Menge Tris der pH-Wert auf der trans-Seite auf etwa 7,5 angehoben, der Einbau verläuft ungehindert weiter. Nach Anheben des pH-Wertes auf der cis-Seite kommt es zu einer Reduktion des Membranstroms, da sich die Kanäle aufgrund ihrer pH-Abhängigkeit häufiger im geschlossenen Zustand befinden. Bis zu diesem Zeitpunkt haben sich ca. 200 Kanäle inkorporiert. Auffallend ist unmittelbar vorher das Durchlaufen eines Zwischenmaximums, das in diesen Versuchen regelmäßig beobachtet wurde. Nach 5 min wird der pH-Wert auf der cis-Seite wieder durch eine entsprechende Menge an Essigsäure (A.A.) auf ca. 4.7 gesenkt, so daß sich die Kanäle wieder öffnen. Dadurch, daß der Membranstrom praktisch ohne Verzögerung sein ursprüngliches Niveau wieder erreicht und weiter anwächst, ist gezeigt, daß sich in der alkalischen Zwischenperiode die Anzahl der Kanäle weder durch Einbau noch durch Ausbau verändert hat.

Wert auf der cis-Seite sowohl die Kinetik als auch den Einbau des Phalloporins steuert (Wilmsen, 1983; Kap. 3.1.1.2). Die anschließende Absenkung auf der cis-Seite führt wegen der pH-Abhängigkeit der Kanalkinetik (Kap. 1.3.3.3) zu einer Reduktion des Membranstroms, da sich die Kanäle bei dem nun leicht basischen pH bevorzugt im geschlossenen Zustand befinden. Auffällig ist dabei in Abb. 3.14, daß der Membranstrom unmittelbar vor seinem Abfallen noch eine kurzzeitige Erhöhung durchläuft. Dieses Verhalten tritt in Experimenten dieser Art regelmäßig in Erscheinung.

Wird der pH-Wert daraufhin nur auf der cis-Seite wieder abgesenkt, öffnen sich die Kanäle wieder. Dabei erreicht der Membranstrom unmittelbar und praktisch ohne Verzögerung sein ursprüngliches Niveau. Dadurch ist gezeigt, daß sich die Anzahl der Kanäle in der Membran während der "alkalischen Zwischenperiode" nicht verringert hat, und es durch Anhebung des pH-Wertes allein zu keinem spontanen Wiederausbau von Phalloporin aus der Membran kommt.

3.1.2.1 Strom-Spannungs-Kennlinien phalloporinhaltiger Membranen

Mit der beschriebenen Perfusionsmethode kann man nun künstliche Lipidmembranen mit einer zeitlich konstanten und definierten Anzahl an Phalloporinkanälen herstellen und deren elektrischen Eigenschaften untersuchen. Die Abb. 3.15 zeigt den Membranstrom I durch eine solche phalloporinhaltige Lipidmembran in Abhängigkeit von der angelegten Spannung (I - V -Kennlinie). Dabei wurde zunächst eine ausreichende Anzahl an Phalloporinkanälen bei einem niedrigen pH-Wert auf der cis-Seite (pH 4.0) inkorporiert, anschließend die Elektrolytlösung auf der cis-Seite durch Perfusion gegen eine Elektrolytlösung ausgetauscht, deren pH-Wert 7.5 betrug. Die aufgenommene I - V -Kennlinie dieser Membran zeigt eine deutliche Gleichrichtereigenschaft: Der Strom wird nur bei positiven Membranspannungen durchgelassen, während bei negativen Spannungen der Stromfluß deutlich geringer ist. Dabei kann man den Strombeitrag der reinen, undotierten Lipidmembran wegen ihrer geringen Eigenleitfähigkeit ($\approx 10^{-8} \text{ S/cm}^2$) vernachlässigen. Die Charakteristik der Strom-Spannungs-Kennlinie einer phalloporinhaltigen Membran wird nun ausschließlich durch die darin enthaltenen Ionenkanäle bestimmt. Offensichtlich bewirken diese eine ausgeprägte Spannungsabhängigkeit der Membranleitfähigkeit g .

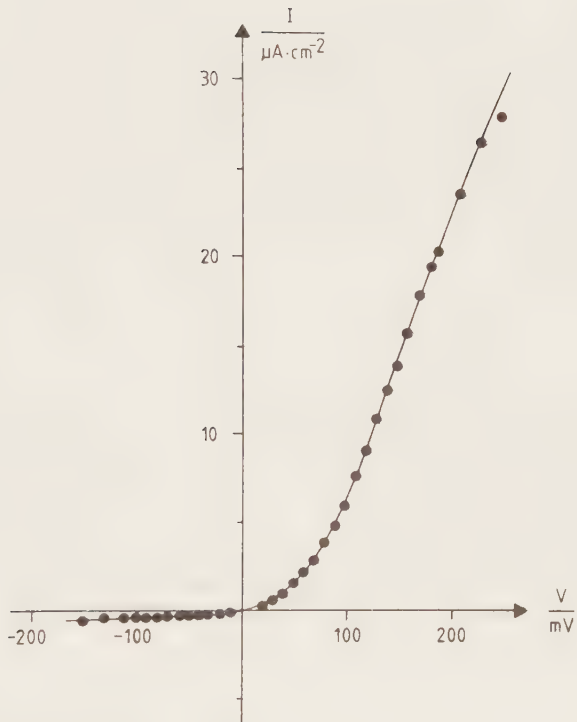


Abb. 3.15: I-V-Kennlinie einer phalloporinhaltigen Lipidmembran bei pH 7.5. Zu Beginn war allein das trans-Kompartiment mit einer Elektrolytlösung vom pH 7.5 gefüllt, während auf der cis-Seite zunächst bei einem pH-Wert von 4.0 etwa 320 Kanäle in die Lipidmembran inkorporiert wurden. Anschließend wurde das cis-Kompartiment mit der pH-7.5-Elektrolytlösung perfundiert und der Membranstrom in Abhängigkeit von der angelegten Spannung gemessen.

Experimentelle Bedingungen:

- Elektrolytlösungen: a) 1 M NaCl; 10 mM Tris-acetat; pH 4.0
 b) 1 M NaCl; 20 mM Hepes, pH 7.5

Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPS; Cholesterol (7:2:1)

Proteinkonzentration: 0.28 μg/ml (cis, vor der Perfusion)

3.1.2.2 Die Spannungsabhängigkeit der phalloporininduzierten Membranleitfähigkeit

Aus den Membranströmen der Abb. 3.15 läßt sich die Leitfähigkeit g der phalloporinhaltigen Lipidmembran nach der Beziehung $g = I/V$ berechnen. Diese ist in Abb. 3.16 aufgetragen. Hier kommt die Spannungsabhängigkeit der Membranleitfähigkeit zum Ausdruck: Bei hohen positiven Membranspannungen ($V > 200$ mV) erreicht g einen Sättigungswert $g_{\max}$ und nimmt zu negativen Membranspannungen hin S-förmig ab, um schließlich einen Minimalwert $g_{\min}$ anzunehmen. Zu beachten ist, daß $g_{\min}$ verschieden von Null ist. Diese verringerte Membranleitfähigkeit bei negativen Spannungen kommt durch den verminderten Membranstrom im entsprechenden Spannungsbereich zum Ausdruck.

3.1.2.3 Korrelation zwischen der Spannungsabhängigkeit des Vielkanal- und Einzelkanalsystems

Wie bereits dargestellt (Kap. 3.1.1.2), ist der Eigenbeitrag der reinen Lipidmembran zum gesamtelektrischen Verhalten vernachlässigbar klein, da die Leitfähigkeit der Membran bereits durch Einbau mehrerer hundert Phalloporinkanäle bei niedrigem pH um mehrere Größenordnungen heraufgesetzt wird. In diesem Fall bestimmen allein die in der Membran enthaltenen Phalloporinkanäle die Membranleitfähigkeit. Die Beziehung

$$g = N \Lambda p_o + g_{\min} \quad (\text{Gl. 3.4})$$

beschreibt den Zusammenhang zwischen der makroskopischen Leitfähigkeit g und den Einzelkanaleigenschaften. Dabei ist N die Anzahl der in der Membran enthaltenen Phalloporinkanäle, Λ der Einzelkanalleitwert und p_o die spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit des Phalloporinkanals. Die Kanalanzahl N bleibt nach Perfusion zeitlich konstant (Kap. 3.1.2). Da außerdem die Strom-Spannungs-Kennlinie des Einzelkanals dem eines ohmschen Widerstandes entspricht (Wilmsen, 1983), ist der Einzelkanalleitwert ebenfalls eine konstante, spannungsunabhängige Größe. Folglich sollte allein die spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit p_o des Einzelkanals die Spannungsabhängigkeit der Membranleitfähigkeit bewirken. Um dies zu überprüfen, wurden die makroskopischen Membranleitfähigkeiten bei 4 verschiedenen pH-Werten gemessen. Wegen der gleichzeitigen pH-Abhängigkeit des Phalloporin-

einzelkanals sollte sich der Zusammenhang zwischen Einzel- und Vielkanalverhalten in einer parallelen pH-Abhängigkeit der Membranleitfähigkeit g und der Offenwahrscheinlichkeit p_o widerspiegeln.

Zum Vergleich mehrerer Leitfähigkeitskurven ist es zunächst notwendig, diese zu normieren, da jeweils unterschiedliche Anzahlen von Kanälen eingebaut und somit auch unterschiedliche absolute Leitfähigkeiten erreicht wurden. Dazu wurde jeweils die von Null verschiedene Minimalleitfähigkeit $g_{\min}$ subtrahiert und das Verhältnis zwischen den so korrigierten Leitfähigkeitswerten $g - g_{\min}$ und der korrigierten Maximalleitfähigkeit bestimmt. Die Beziehung für die normierte Membranleitfähigkeit L lautet also:

$$L = \frac{g - g_{\min}}{g_{\max} - g_{\min}} \quad (\text{Gl. 3.5})$$

L ist eine dimensionslose Größe, die Werte zwischen 0 und 1 annehmen kann. Parallel zur Messung der makroskopischen Membranleitfähigkeit wurden die Offenwahrscheinlichkeiten p_o des Phalloporineinzelkanals unter identischen Versuchsbedingungen bestimmt.

Die pH- und Spannungsabhängigkeiten beider Größen L und p_o sind in Abb. 3.17 wiedergegeben. Die Kurven für die entsprechenden pH-Werte im oberen und unteren Diagramm lassen sich mit guter Näherung zur Deckung bringen, die jeweiligen Verschiebungen entlang der Spannungsachse sind geringfügig. Als Referenzpunkte der Kurven kann man die jeweiligen Mittenspannungen $V_o(p_o)$ und $V_o(L)$ angeben, bei denen L bzw. p_o den Wert 0.5 annimmt (s. Kap. 1.1.6). Die Verschiebungen zwischen den Kurven lassen sich als die jeweilige Differenz $V_o(p_o) - V_o(L) = \Delta V_o$ angeben:

pH 7.5: $\Delta V_o = 4$ mV; pH 6.5: $\Delta V_o = 18$ mV; pH 6.0: $\Delta V_o = -1$ mV.

Die größte Verschiebung zwischen p_o - und L -Kurve tritt bei pH 6,5 auf, die p_o -Kurve ist hier um 18 mV gegenüber der L -Kurve entlang der Spannungsachse verschoben. Bei den pH-Werten 6,0, 6,5 und 7,5 können die makroskopischen Membranleitfähigkeiten L und die Einzelkanal-Offenwahrscheinlichkeiten p_o mit guter Näherung korreliert werden.

Die Abb. 3.17 zeigt, daß das für den niedrigsten gemessenen pH-Wert (5.5) nicht mehr zutrifft. Bei diesem pH-Wert tritt eine starke Anomalie im unteren Teil der L -Kurve ($L < 0,5$) auf. Dieses Phänomen wird in den folgenden Kapiteln im einzelnen dargestellt.

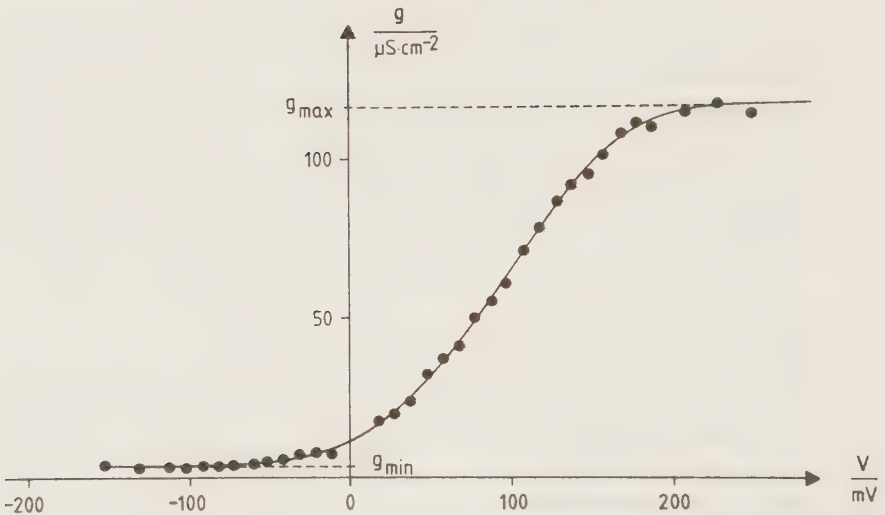


Abb. 3.16: Die spannungsabhängige Leitfähigkeit g einer phalloporinhaltigen Lipidmembran bei pH 7.5 (g - V -Kennlinie). Die Leitfähigkeiten wurden aus den Stromwerten in Abb. 3.15 nach der Beziehung $g = I/V$ berechnet. Die Kurve erreicht bei hohen positiven Spannungen einen Sättigungswert g_{max} und bei hohen negativen Spannungen einen Minimalwert g_{min} . Experimentelle Bedingungen siehe unter Abb. 3.15.

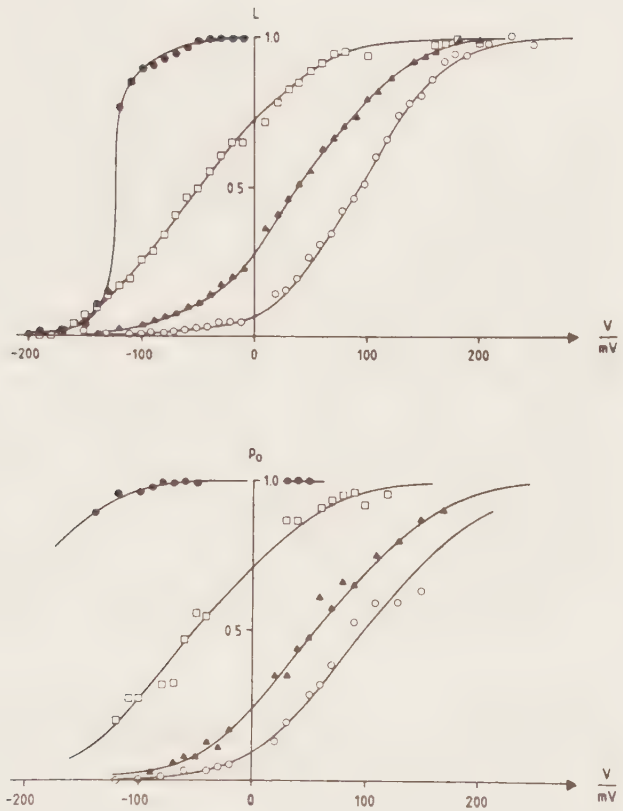


Abb. 3.17: Die Korrelation zwischen normierter makroskopischer Membranleitfähigkeit L phalloporinhaltiger Lipidmembranen und der spannungsabhängigen Offenwahrscheinlichkeit p_0 des Phalloporineinzelkanals. Die Membranleitfähigkeiten wurden gemäß Gl. 3.5 normiert. Gezeigt sind L und p_0 bei 4 verschiedenen pH-Werten in der Elektrolytlösung:

● = 5.5; □ = 6.0; ▲ = 6.5; ○ = 7.5.

Nähere Erläuterungen s. Text.

Experimentelle Bedingungen:

Elektrolytlösung: 1 M NaCl; 20 mM Puffer

verwendete Puffer: pH 5.5, 6.0; 6.5: Mes

pH 7.5: Hepes

Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPS; Cholesterol (7:2:1)

3.1.3 Spannungsinduzierte Inaktivierung von Phalloporinkanälen bei niedrigen pH-Werten

Die Abb. 3.17 zeigt, daß die L-Kurve für die makroskopische Membranleitfähigkeit bei pH 5.5 und Spannungen von $V < -120$ mV im Vergleich zu den L-Kurven der höheren pH-Werte sehr viel steiler abfällt. Im engen Spannungsbereich zwischen -120 mV und -150 mV wird die normierte Leitfähigkeit L drastisch von 0.76 auf 0.04 reduziert. Eine solch anomal starke, spannungsabhängige Reduzierung tritt dagegen bei der Einzelkanal- p_o -Kurve bei pH 5.5 nicht deutlich hervor. Offensichtlich kommt es bei pH-Werten, die kleiner sind als 6.0, zu einer Diskrepanz zwischen dem Einzel- und dem Vielkanalverhalten, da sich die makroskopische Membranleitfähigkeit in diesem pH-Bereich nicht mehr vollständig mit der spannungsabhängigen Einzelkanalkinetik zur Deckung bringen läßt. Bei pH-Werten von 5.5 und niedriger findet bei hohen negativen Spannungen eine irreversible, vollständige Inaktivierung von Phalloporinkanälen statt, die aber nicht auf der spannungsabhängigen Einzelkanalkinetik beruht. Dieses Phänomen ist in Abb. 3.18 an einer phalloporinhaltigen Lipidmembran bei pH 5.5 dargestellt. Legt man an eine solche Membran, von 0 mV ausgehend, rechteckförmige Spannungspulse zu negativen Spannungen an, so verläuft der Membranstrom bei Sprungspannungen $V > -110$ mV mit guter Näherung entsprechend einer linearen I-V-Kennlinie, da die normierte Membranleitfähigkeit L nach Abb. 3.17 in diesem Bereich weitgehend konstant ($L \approx 1$) ist. Außerdem bleibt der Wert des Membranstroms nach einem solchen Spannungssprung zeitlich konstant. Wird jedoch eine Schwellenspannung von etwa -120 mV unterschritten, so erreicht der Membranstrom unmittelbar nach dem Spannungssprung zunächst einen Spitzenwert I_o , um dann jedoch im Verlauf der Zeit abzuklingen. Nach einem Sprung von 0 mV zu -130 mV relaxiert der Membranstrom, bis er nach etwa 4 Minuten einen Endwert I_∞ angenommen hat, der nur noch ca. 20 Prozent des anfänglichen Spitzenwertes I_o beträgt. Dieser zeitabhängige, inaktivierende Membranstrom kann nicht allein auf der spannungsabhängigen Einzelkanalkinetik des Phalloporins beruhen, da zum einen die normierte makroskopische Membranleitfähigkeit L bei Spannungen $V < -120$ mV stärker reduziert wird, als allein aufgrund der spannungsabhängigen Offenwahrscheinlichkeit p_o zu erwarten wäre, und zum anderen diese Inaktivierung irreversibel ist. Die ursprüngliche Membranleitfähigkeit wird bei einem Spannungssprung zurück zu niedrigen, nicht inaktivierenden negativen

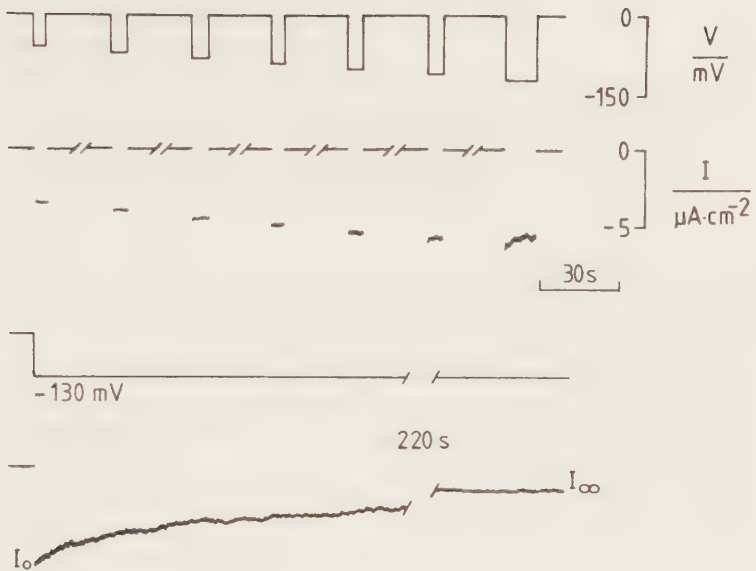


Abb. 3.18: Die Inaktivierung des Membranstroms einer phalloporinhaltigen Membran bei pH 5.5 durch hohe negative Spannungen. An die Membran wurden ausgehend von 0 mV Spannungssprünge zu negativen Spannungen angelegt: in fortschreitender Reihe zu -60 mV, -70 mV, -80 mV, -90 mV, -100 mV, -110 mV, -120 mV (obere Spuren) und zu -130 mV (untere Spur). Im Spannungsbereich von -60 mV bis -110 mV verläuft der Membranstrom entsprechend einer linearen I-V-Kennlinie. Bei Spannungen negativer als -110 mV kommt es zu einer zeitabhängigen Inaktivierung des Membranstroms. Die Badlösung der cis-Seite der Membran wurde vor den Sprungexperimenten perfundiert. Experimentelle Bedingungen s. Abb. 3.17.

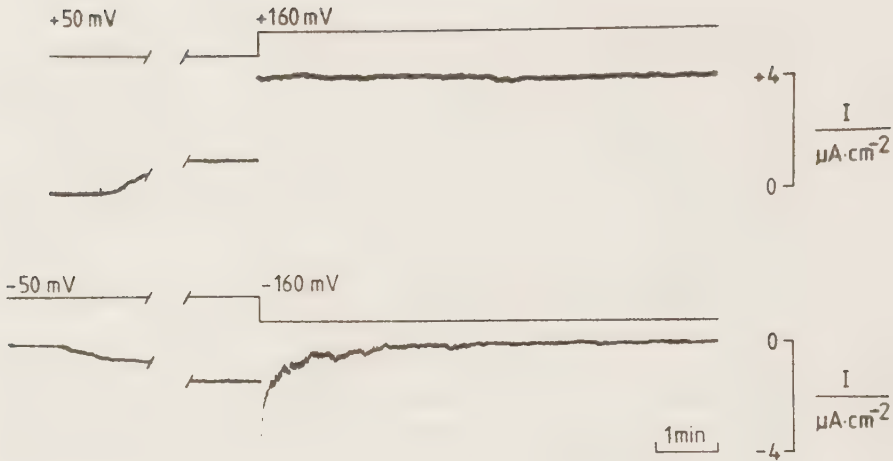


Abb. 3.19: Die Inaktivierung des Membranstroms bei niedrigen pH-Werten erfolgt nur bei hohen negativen Spannungen. Gezeigt ist der Verlauf des Membranstroms ausgehend von der Zugabe und dem Einbau von Phalloporin bei einem pH-Wert von 4.2 auf der cis-Seite. Die Spurunterbrechungen markieren den Perfusionsvorgang, dabei wurde der pH-Wert auf der cis-Seite auf 5.5 geändert. Der Einbau erfolgte einmal bei +50 mV (obere Stromspur), der Membranstrom bleibt sowohl nach der Perfusion als auch nach einem Spannungssprung auf +160 mV zeitlich konstant. Die untere Stromspur zeigt die Inkorporation bei -50 mV. Der Spannungssprung zu -160 mV nach der Perfusion führt zu einer zeitabhängigen Inaktivierung des Membranstroms. Experimentelle Bedingungen:

Elektrolyttlösungen: a) 1 M NaCl; 10 mM Tris-acetat, pH 4.2

b) 1 M NaCl; 20 mM Mes, pH 5.5

Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPS; Cholesterol (7:2:1)

Spannungen ($V > -110$ mV) nicht wieder erreicht (s.u., Kap. 3.1.3.1 und 3.1.3.3). Das spannungsabhängige Schaltverhalten der Phalloporineinzelkanäle ist dagegen voll reversibel.

Dieses Phänomen einer irreversiblen Inaktivierung tritt nur bei hohen negativen Spannungen auf, bei entsprechend hohen positiven Membranspannungen bleibt der Membranstrom dagegen zeitlich konstant (Abb. 3.19).

3.1.3.1 Die Zeit- und Spannungsabhängigkeit des Inaktivierungsstroms

Die Abb. 3.20 zeigt den Verlauf zweier Kurven des Membranstroms ausgehend von der Zugabe von Phalloporin, Einbau und Perfusion. Ein Spannungssprung zu -140 mV führt in der beschriebenen Weise zu einer Inaktivierung des Membranstroms, die sich über mehrere Minuten hinzieht. Wird der Membranstrom dagegen durch einen Sprung auf -190 mV inaktiviert, so verläuft die Relaxation schneller und ist nach 1 Minute bereits weitgehend abgeschlossen. Der Inaktivierungsprozeß ist offenbar spannungsabhängig und vollzieht sich umso rascher, je höher der Betrag der negativen Inaktivierungsspannung ist.

Ist I_0 der Stromwert zum Zeitpunkt $t = 0$ unmittelbar nach dem Spannungssprung, $I(t)$ der Stromwert zum Zeitpunkt t und I_∞ der erreichte Endwert, so lassen sich die Inaktivierungsströme verschiedener Membranen normieren und vergleichen. Für diesen normierten Inaktivierungsstrom R_i gilt die Beziehung:

$$R_i = \frac{I(t) - I_\infty}{I_0 - I_\infty} \quad (\text{Gl. 3.6})$$

In Abb. 3.21 ist der Zeitverlauf der normierten Inaktivierungsströme R_i bei -140 mV und -190 mV halblogarithmisch aufgetragen. Der zeitliche Verlauf von R_i läßt sich dabei mit guter Näherung als ein einfach exponentieller Prozeß beschreiben:

$$R_i = e^{-t/\tau_i} \quad (\text{Gl. 3.7})$$

τ_i ist die Zeitkonstante dieses Prozesses und gibt die Zeitspanne an, in der der Strom jeweils auf ein e-tel eines Anfangswertes abklingt. Sie läßt sich bei halblogarithmischer Darstellung aus den Steigungen der Geraden für R_i bestimmen (Abb. 3.21). τ_i ist somit ein Maß für die Geschwindigkeit

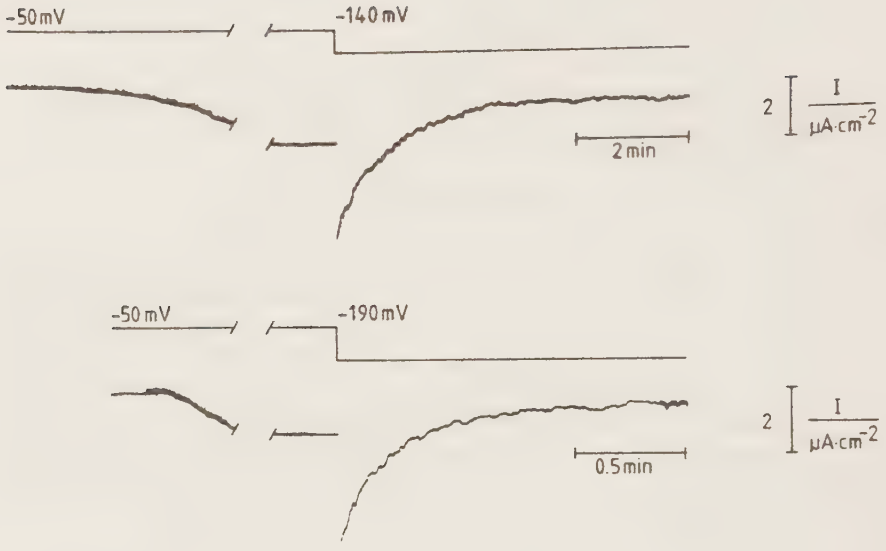


Abb. 3.20: Der Inaktivierungsstrom zweier phalloporinhaltiger Lipidmembranen bei -140 mV und -190 mV. Die Stromkurven beginnen mit der Inkorporation von Phalloporin bei pH 4.2 auf der cis-Seite und einer angelegten Membranspannung von -50 mV. Der Moment der Phalloporinzugabe ist nicht gekennzeichnet. Die Spurunterbrechungen markieren die Perfusion, durch die der pH-Wert auf 4.5 geändert wurde. Nach der Perfusion bleibt der Membranstrom bei einer angelegten Spannung von -50 mV konstant. Die Spannungssprünge zu hohen negativen Spannungen führen anschließend zu einer Reduktion des Membranstroms im Verlauf der Zeit. Dieser Inaktivierungsprozeß verläuft bei -190 mV schneller als bei -140 mV (vergl. die Zeiteichbalken!).

Experimentelle Bedingungen:

Elektrolytlösungen: a) 1 M NaCl; 10 mM Tris-acetat, pH 4.2

b) 1 M NaCl; 20 mM Tris-acetat, pH 4.5

Membranzusammensetzung: 1,2 POPC; 1,2-DOPS; Cholesterol (7:2:1)

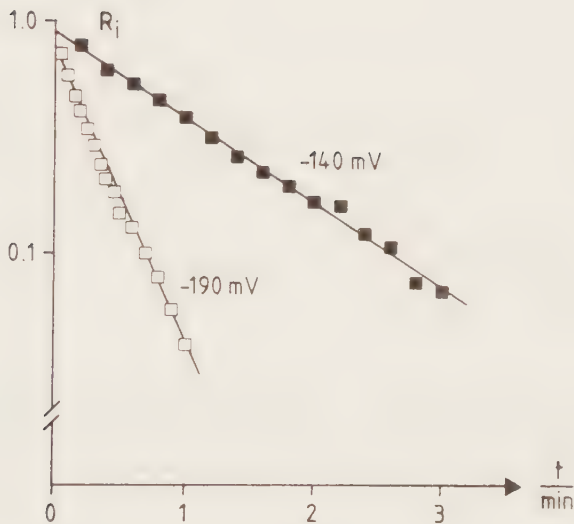


Abb. 3.21: Halblogarithmische Darstellung der zeitlichen Abklingkurve des normierten Inaktivierungsstroms R_i (s. Text). Der Zeitpunkt $t = 0$ bezieht sich auf den Moment, in dem der Spannungssprung auf -140 mV bzw. -190 mV erfolgt. Der Zeitverlauf des Inaktivierungsvorgangs läßt sich mit guter Näherung als ein einfach exponentieller Prozeß beschreiben, dessen zeitliches Verhalten durch eine Zeitkonstante τ_i der Inaktivierung beschrieben wird. τ_i ergibt sich aus den Steigungen der Geraden. Bei -140 mV erhält man für τ_i einen Wert von 1.20 min , bei -190 mV einen Wert von 0.34 min .

Experimentelle Bedingungen s. Abb. 3.20.

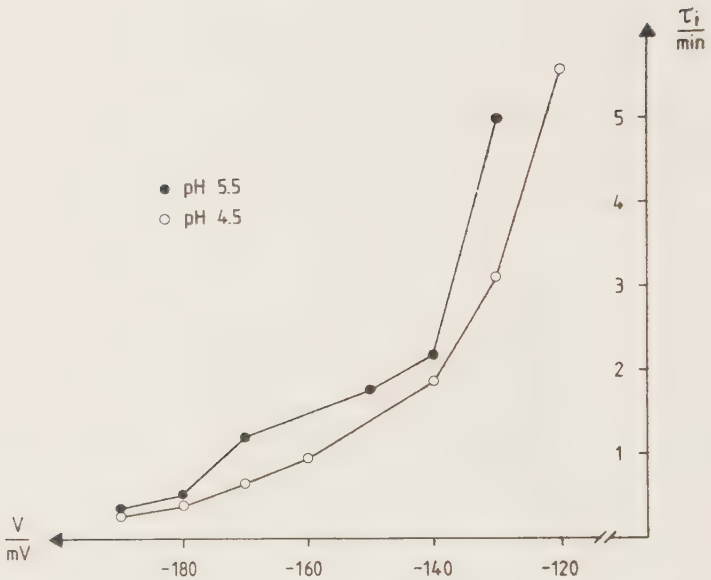


Abb. 3.22: Die Zeitkonstante τ_i in Abhängigkeit von der Sprungspannung bei pH 5.5 und pH 4.5. Höhere negative Spannungen führen zu einer Beschleunigung des Inaktivierungsprozesses und somit zur Verringerung der Zeitkonstanten. Die Inaktivierung ist nur schwach pH-abhängig und verläuft bei pH 4.5 geringfügig schneller als bei pH 5.5. Die Datenpunkte sind die Mittelwerte aus jeweils 2 Experimenten.

Elektrolytlösungen:

a) vor der Perfusion auf cis:

1 M NaCl; 10 mM Tris-acetat, pH 4.2

b) nach der Perfusion:

1 M NaCl, 20 mM Tris-acetat; pH 4.5

1 M NaCl; 20 mM Mes, pH 5.5

angelegte Haltespannung

vor dem Spannungssprung: -50 mV

Proteinkonzentration und Lipidzusammensetzung s. Abb. 3.20.

dieses Prozesses und beträgt in den dargestellten Beispielen (Abb. 3.21) 1.20 min bei -140 mV und 0.34 min bei -190 mV.

Die Zeitkonstanten τ_i sind in Abb. 3.22 als Funktion der Sprungspannung dargestellt. Ausgehend von -120 mV verläuft der Inaktivierungsprozeß umso schneller (τ_i wird umso kleiner), je höher die negative Sprungspannung wird.

Die Inaktivierung ist nur schwach vom pH-Wert abhängig; sie verläuft bei pH 4.5 nur geringfügig schneller als bei pH 5.5 (Abb. 3.22).

3.1.3.2 Inaktivierung des Einzelkanals

Das in den vorhergehenden Kapiteln beschriebene Verhalten phalloporinhaltiger Membranen bei pH 4.5 und 5.5 und hohen negativen Spannungen gibt das Verhalten auf der Vielkanalebene wieder. Die Frage ist nun, ob sich ein solches Phänomen der irreversiblen Inaktivierung unter diesen Bedingungen auch auf der Ebene von Einzelkanälen darstellen läßt. Abb. 3.23 zeigt das Fluktuationsverhalten von nur zwei Phalloporinkanälen in einer Lipidmembran bei pH 5.5. Bei einer niedrigen Haltespannung von -50 mV befinden sich beide praktisch nur im offenen Zustand, Schließereignisse sind selten und kurz. Wird die Membranspannung auf -150 mV geändert, so treten die Schließereignisse aufgrund der spannungsabhängigen Kinetik wie erwartet öfter auf, die Veränderung des Schaltverhaltens tritt ohne Verzögerung ein. Nach einigen Sekunden schalten beide Kanäle dann vollständig ab und bleiben auch inaktiv, wenn die Membranspannung wieder auf -50 mV heraufgesetzt wird. Dieses Verhalten macht deutlich, daß die spannungsabhängige Einzelkanalkinetik und die irreversible Inaktivierung zwei voneinander unabhängige Verhaltensweisen des Phalloporins darstellen. Die irreversible Inaktivierung des makroskopischen Membranstroms bei niedrigen pH-Werten beruht nicht auf der spannungsabhängigen Einzelkanalkinetik, sondern vielmehr auf dem *vollständigen und irreversiblen* Ausschalten der Phalloporinkanäle durch hohe Spannungen. Dieses vollständige Ausschalten erklärt die zeitabhängige, drastische Reduktion der Membranleitfähigkeit bei pH 5.5 und Spannungen $V < -120$ mV (Abb. 3.17).

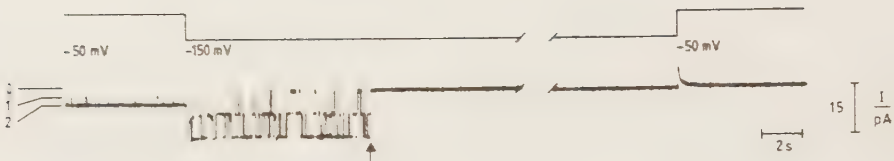


Abb. 3.23: Die irreversible Inaktivierung von Phalloporineinzelkanälen durch hohe negative Spannungen bei pH 5.5. Gezeigt sind Stromfluktuationen zweier Phalloporinkanäle in einer Lipidmembran, deren Ereignisse sich überlagern. Die Markierungen am linken Rand geben die Stromniveaus der reinen Lipidmembran (0) sowie der Offenzustände eines (1) und beider (2) Kanäle an. Bei -50 mV befinden sich beide Kanäle überwiegend in ihren offenen Zuständen, Schließereignisse, erkennbar als Stromänderungen nach oben, sind selten und kurz. Bei Umschalten auf -150 mV ändern die Kanäle ihre Schaltkinetik aufgrund der Spannungsabhängigkeit praktisch verzögerungsfrei, Schließereignisse treten häufiger auf. Nach einigen Sekunden schalten beide Kanäle vollständig aus (Pfeil) und bleiben inaktiv, wenn die Haltespannung wieder auf -50 mV herabgesetzt wird (Stromniveau 0).
Elektrolytlösung: 1 M NaCl; 20 mM Mes, pH 5.5
Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPS; Cholesterin (7:2:1)

3.1.3.3 pH-abhängige Recovery nach spannungsinduzierter Inaktivierung

In Kap. 3.1.3 wurde erwähnt, daß die Reduktion der Membranleitfähigkeit bei pH 5.5 und hohen negativen Spannungen irreversibel ist. Nach einem solchen Inaktivierungsprozeß wird die ursprüngliche Membranleitfähigkeit nicht wieder erreicht, wenn die Membranspannung wieder auf nicht inaktivierende Spannungen ($V > -120$ mV) heraufgesetzt wird. Dies ist in der oberen Stromspur der Abb. 3.24 dargestellt. Der Membranstrom einer phalloporinhaltigen Lipidmembran wird bei pH 5.5 durch einen Spannungssprung auf -160 mV zunächst inaktiviert. Nachdem ein Endwert erreicht ist, wird die Membranspannung wieder auf -50 mV heraufgesetzt. Der Membranstrom nimmt einen Wert an, der deutlich unter dem vor dem inaktivierenden Spannungssprung liegt (Stromniveau links). Die Membranleitfähigkeit ist irreversibel reduziert. Die mittlere Spur der Abb. 3.24 zeigt die Inaktivierung des Membranstroms bei nun pH 4.5. Die Membranleitfähigkeit wird hierbei auf etwa 5 Prozent reduziert. Setzt man nun die Membranspannung wieder auf -50 mV herauf, so wächst der Strom, ausgehend von einem Anfangsstrom I_0 im Moment des Umschaltens, langsam an und erreicht nach 5-10 Minuten einen Endwert I_∞ , der etwa 81 Prozent des Wertes vor der Inaktivierung beträgt. Offensichtlich kann sich die durch hohe Spannung vorher reduzierte Membranleitfähigkeit bei pH 4.5 wieder teilweise "erholen", wenn die Membranspannung auf einen nicht inaktivierenden Wert zurückgeschaltet wird.

Erfolgt die Inaktivierung des Membranstroms und das anschließende Zurückschalten auf -50 mV bei einem noch niedrigeren pH-Wert (pH 4.0), so beträgt die Erholung der Membranleitfähigkeit praktisch 100 Prozent, da in diesem Fall der Membranstromwert vor der Inaktivierung wieder vollständig erreicht wird (Abb. 3.24, untere Spur).

Diese Versuche zeigen, daß es neben einer spannungsinduzierten Reduktion eine pH-abhängige Erholung der Leitfähigkeit in phalloporinhaltigen Lipidmembranen gibt. Bei pH 5.5 ist die Inaktivierung irreversibel, bei pH 4.0 dagegen vollständig reversibel. Man muß dabei im Auge behalten, daß die Membranen vor der Inaktivierung perfundiert wurden und kein freies Phalloporin mehr in der wäßrigen Phase vorhanden ist. Deshalb können nur die vorher inaktivierten Phalloporinkanäle diese Erholung bewirken.

Die pH-abhängige Erholung der Membranleitfähigkeit bei niedrigen Spannungen ($V \geq -50$ mV) wird im folgenden als *Recovery* bezeichnet.

Der Zeitverlauf dieses Recoverystroms läßt sich wie der spannungsinduzierte

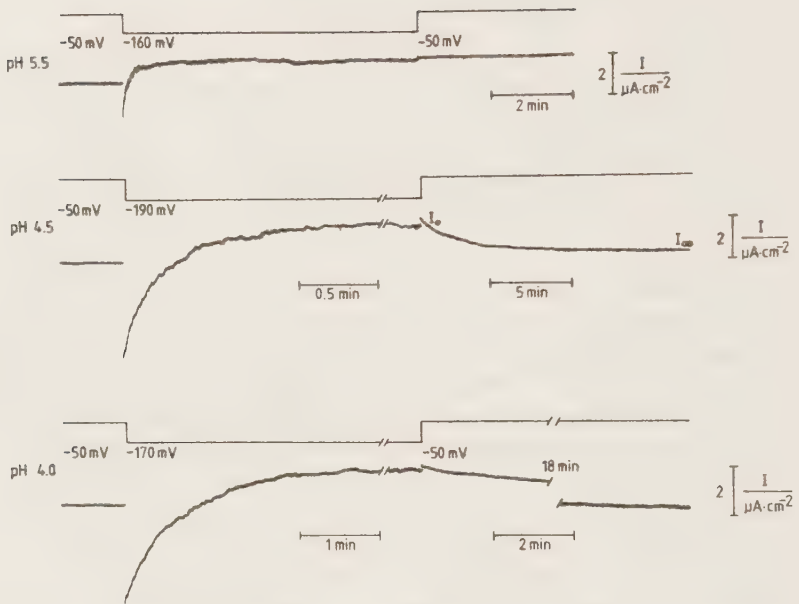


Abb. 3.24: Die pH-abhängige Erholung (Recovery) der Membranleitfähigkeit nach einer spannungsinduzierten Inaktivierung des Membranstroms. Gezeigt ist der Strom durch eine phalloporinhaltige Lipidmembran bei 3 verschiedenen pH-Werten. Nach Einbau und Perfusion (nicht gezeigt) werden die Membranen zunächst bei einer Membranspannung von -50 mV gehalten und anschließend die Membranleitfähigkeiten durch hohe Spannungen reduziert (exponentieller Abfall des Membranstroms).

Obere Stromspur: pH 5.5. Der Membranstrom bleibt auf dem inaktivierten Niveau, nachdem die Spannung auf -50 mV zurückgeschaltet wird (vergl. mit dem Stromwert vor der Inaktivierung, links).

Mittlere Stromspur: pH 4.5. Nach Herabsetzen der Membranspannung kommt es zu einem Wiederanstieg des Membranstroms, der eine zeitabhängige Erholung der Membranleitfähigkeit auf 81 Prozent des ursprünglichen Wertes (Stromniveau links) widerspiegelt.

Untere Stromspur: pH 4.0. Nach der Inaktivierung wird die ursprüngliche Membranleitfähigkeit bei -50 mV zu praktisch 100 Prozent wiedererlangt.

Experimentelle Bedingungen:

Elektrolytlösung: 1 M NaCl; 20 mM Mes (Tris-acetat), pH 5.5 (4.5; 4.0)

Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPS; Cholesterol (7:2:1)

Proteinkonzentration: 0.28 $\mu g/ml$ (cis, vor Perfusion)

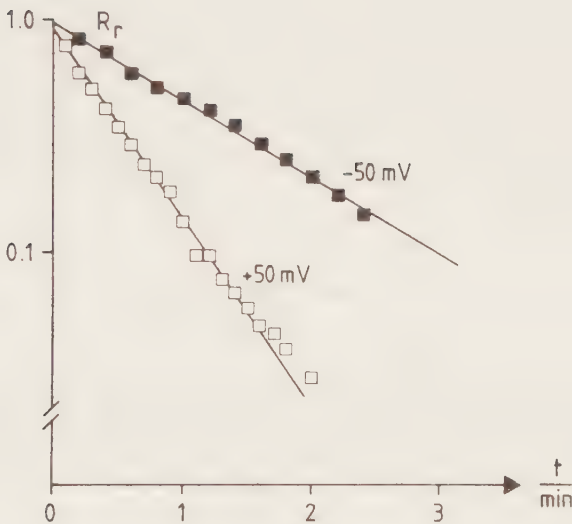


Abb. 3.25: Halblogarithmische Darstellung des Recoverystroms nach spannungsinduzierter Inaktivierung bei pH 4.5. Die Ströme wurden normiert (Erläuterungen s. Text). Die Kurvenverläufe lassen sich mit guter Näherung als Geraden gemäß einem einfachen exponentiellen Prozeß beschreiben. In einem Experiment wurde die Membranspannung nach der Inaktivierung auf -50 mV, in dem anderen Experiment auf +50 mV zurückgeschaltet. Die Zeitkonstanten τ_r betragen: 1.33 min (-50 mV) und 0.53 min (+50 mV). Die Membranen wurden vor der Inaktivierung perfundiert.
Elektrolytlösung: 1 M NaCl; 20 mM Tris-acetat, pH 4.5
Membranzusammensetzung und Proteinkonzentration s. Abb. 3.24.

Inaktivierungsstrom als ein einfach exponentieller Prozeß beschreiben, wie Abb. 3.25 veranschaulicht. Die Stromkurven des Recoveryprozesses werden dabei entsprechend zu Kap. 3.1.3.1 normiert, wobei gilt:

$$R_r = \frac{I(t) - I_\infty}{I_0 - I_\infty} \quad (\text{Gl. 3.8})$$

Dabei ist R_r der dimensionslose Normwert, I_∞ der erreichte Endwert des Recoverystroms und I_0 der Membranstrom zum Zeitpunkt $t = 0$ nach dem Spannungssprung. Die Abb. 3.25 zeigt die halblogarithmische Auftragung des Zeitverlaufs von R_r , wobei die Membranspannung nach der Inaktivierung einmal auf -50 mV und einmal auf $+50$ mV zurückgeschaltet wurde. Beide Kurven lassen sich mit guter Näherung durch Geraden anpassen. Der Zeitverlauf der Recovery R_r läßt sich demnach formal durch die Beziehung

$$R_r = e^{-t/\tau_r} \quad (\text{Gl. 3.9})$$

beschreiben. R_r kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen, τ_r ist die Zeitkonstante des Recoveryprozesses und gibt den Zeitraum an, in dem der Membranstrom auf das e -fache anwächst.

Abb. 3.25 zeigt ferner, daß sich der Recoveryprozeß bei $+50$ mV schneller vollzieht ($\tau_r = 0.53$ min) als bei -50 mV ($\tau_r = 1.33$ min). Die Mittelwerte der Zeitkonstanten τ_r betragen bei pH 4.5: 1.78 ± 0.60 min ($n = 7$) bei -50 mV und 0.45 ± 0.07 min ($n = 3$) bei $+50$ mV.

3.1.4 Weitere Eigenschaften des Phalloporineinzelkanals

In diesem Kapitel werden zusätzliche Eigenschaften beschrieben, die an einzelnen Phalloporinkanälen gemessen wurden. Diese ermöglichen einen Aufschluß über den Mechanismus der Ionenleitung durch den Kanal und eine Abschätzung über die Kanalgröße.

Bei Permeabilitätsmessungen (Kap. 3.1.4.1 bis 3.1.4.3) ist zu beachten, daß das Prinzip der makroskopischen Elektroneutralität für die etwa 7 nm dicke Membran nicht mehr uneingeschränkt gilt, wenn diese eine elektrische Nettooberflächenladung trägt. Die Debye-Länge l_D , in der das Oberflächenpotential $\phi(x)$ an der Membran auf ein e -tel abfällt, liegt in derselben Größenordnung wie die Membrandicke, und es kommt im Falle einer negativen

Nettooberflächenladung zu einer Anreicherung von Kationen und zu einer Verarmung an Anionen an der Membran-Wasser-Grenzfläche. Um solche Effekte bei den Permeabilitätsmessungen am Phalloporinkanal auszuschließen, wurden Lipidmembranen verwendet, die anstelle des negativ geladenen 1,2-DOPS das elektrisch neutrale 1,2-DOPE enthielten.

3.1.4.1 Permeabilität für Na^+ - und Cl^- -Ionen

Das Permeabilitätsverhältnis $b_{K/A}$ für das Kation K^+ und das Anion A^- eines Salzes läßt sich experimentell bestimmen, wenn zu beiden Seiten der Membran unterschiedlich konzentrierte Lösungen des Salzes KA vorliegen. In diesem Fall kommt es im stationären Zustand zur Ausbildung einer Membranspannung (biionisches Potential), bei der durch den Kanal kein Nettotransport von Ladungen in Richtung des Konzentrationsgefälles mehr erfolgt.

Dieses Membranpotential stellt sich gemäß der Goldman-Gleichung (Goldman, 1943) ein, die in ihrer allgemeinen Form für ein System mit beliebig vielen einwertigen Ionensorten lautet (Index ν für Kationen, Index μ für Anionen):

$$E_{\text{rev}} = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{\nu} c'_{\nu} + P_{\mu} c''_{\mu}}{P_{\nu} c''_{\nu} + P_{\mu} c'_{\mu}} \quad (\text{Gl. 3.10})$$

Dabei sind P_{ν} und P_{μ} die Permeabilitätskoeffizienten der Ionensorten ν und μ , c_{ν} bzw. c_{μ} die Ionenaktivitäten der Ionensorten ν und μ auf der cis- (c') und auf der trans-Seite (c''). In diesem speziellen Fall, in dem nur Na^+ - und Cl^- -Ionen vorhanden sind (die Ionen der Puffersubstanzen werden hier und im folgenden außer acht gelassen), lautet die Goldman-Gleichung:

$$E_{\text{rev}} = \frac{RT}{F} \ln \frac{b_{\text{Na/Cl}} c''_{\text{Na}} + c'_{\text{Cl}}}{b_{\text{Na/Cl}} c'_{\text{Na}} + c''_{\text{Cl}}} \quad (\text{Gl. 3.11})$$

Dabei ist $b_{\text{Na/Cl}}$ das gesuchte Permeabilitätsverhältnis zwischen den Permeabilitäten P_{Na} und P_{Cl} . Der Nettostrom durch den geöffneten Einzelkanal verschwindet, wenn die angelegte Membranspannung U gleich der Umkehrspannung E_{rev} ist.

Abb. 3.26 zeigt die Strom-Spannungs-Kurve eines individuellen Phalloporinkanals unter solchen asymmetrischen ionalen Bedingungen. Das cis-Kompartiment enthält eine zehnfach höher konzentrierte NaCl -Lösung als das trans-Kompartiment, was einem Aktivitätsverhältnis von etwa 8.4 entspricht (D'Ans und Lax, 1967). Das Umkehrpotential, bei dem der Einzelkanalstrom ver-

schwindet, erhält man hier als den Schnittpunkt mit der V-Achse. E_{rev} liegt unter diesen Bedingungen bei -51 mV, wobei sich das Vorzeichen definitionsgemäß auf die cis-Seite der Membran bezieht. Nach der Goldman-Gleichung läßt sich daraus ein Permeabilitätsverhältnis $b_{Na/Cl} = P_{Na}/P_{Cl}$ von etwa 62 berechnen.

3.1.4.2 Permeabilitätsverhältnis zwischen Li^+ - und Na^+ -Ionen

Analog zu Kap. 3.1.4.1 läßt sich das Permeabilitätsverhältnis zwischen Li^+ - und Na^+ -Ionen experimentell bestimmen, wenn ein Kompartiment eine NaCl-, das andere Kompartiment eine LiCl-Lösung enthält. Für das Umkehrpotential E_{rev} gilt dann die Goldman-Gleichung in der Form:

$$E_{rev} = \frac{RT}{F} \ln \frac{b_{Li/Cl} c_{Li}'' + c_{Cl}'}{b_{Na/Cl} c_{Na}' + c_{Cl}''} \quad (Gl. 3.12)$$

Dabei sind $b_{Li/Cl}$ und $b_{Na/Cl}$ die Permeabilitätsverhältnisse zwischen Li^+ und Cl^- bzw. zwischen Na^+ und Cl^- , c_{Li} , c_{Na} , c_{Cl} und c_{Cl} die Ionenaktivitäten der entsprechenden Ionensorten auf der cis- (c') und trans-Seite (c'').

Die Bestimmung des Umkehrpotentials unter diesen Bedingungen mit Hilfe einer Einzelkanal-Strom-Spannungs-Kurve zeigt die Abb. 3.27. Der Nettostrom durch den Phalloporineinzelkanal verschwindet bei einer Membranspannung von $U = E_{rev} = -5$ mV. Mit dem bekannten Wert für $b_{Na/Cl}$ (Kap. 3.1.4.1) errechnet sich ein Permeabilitätsverhältnis $b_{Li/Cl}$ zwischen Li^+ und Cl^- von 44. Damit läßt sich auch sofort das Permeabilitätsverhältnis $b_{Na/Li}$ zwischen Na^+ - und Li^+ -Ionen angeben, denn es gilt:

$$b_{Li/Cl} = 44 = \frac{P_{Li}}{P_{Cl}} \quad (Gl. 3.13)$$

$$b_{Na/Cl} = 62 = \frac{P_{Na}}{P_{Cl}} \quad (Gl. 3.14)$$

Ferner gilt mit den Gl. 3.13 und 3.14:

$$b_{Na/Li} = \frac{b_{Na/Cl}}{b_{Li/Cl}} = 1.4 \quad (Gl. 3.15)$$

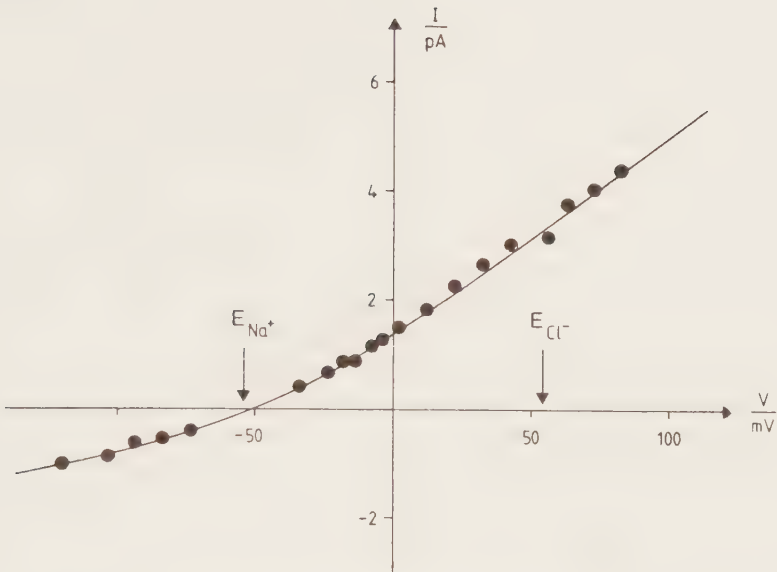


Abb. 3.26: Bestimmung des Permeabilitätsverhältnisses des Phalloporinkanals für Na^+ - und Cl^- -Ionen mit Hilfe des Umkehrpotentials E_{rev} . Das cis- und das trans-Kompartiment enthielten dazu unterschiedlich konzentrierte Lösungen von NaCl, entsprechend einem Verhältnis der Ionenaktivitäten von etwa 8,4 : 1.

cis-Kompartiment: 1.0 M NaCl; 10 mM Tris-acetat, pH 7.0

trans-Kompartiment: 0.1 M NaCl; 10 mM Tris-acetat, pH 7.0

Die unterschiedlichen Cl^- -Aktivitäten rufen an den Ag-AgCl-Elektroden ein Elektrodenpotential hervor, mit dem alle Spannungsangaben korrigiert wurden. Das Umkehrpotential $E_{\text{rev}} = -51$ mV liegt näher am Na^+ -Gleichgewichtspotential $E_{\text{Na}} = -54$ mV als am Cl^- -Gleichgewichtspotential $E_{\text{Cl}} = +54$ mV. Der Phalloporinkanal ist somit mit einem Permeabilitätsverhältnis von etwa 62 : 1 bevorzugt permeabel für Na^+ -Ionen gegenüber Cl^- -Ionen.

Der Einbau des Phalloporineinzelkanals erfolgte zu Beginn bei pH 5.0. Danach wurde der pH-Wert durch Zugabe einer entsprechenden Menge Tris auf beiden Seiten auf pH 7.0 eingestellt.

Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPE; Cholesterol (7:2:1)

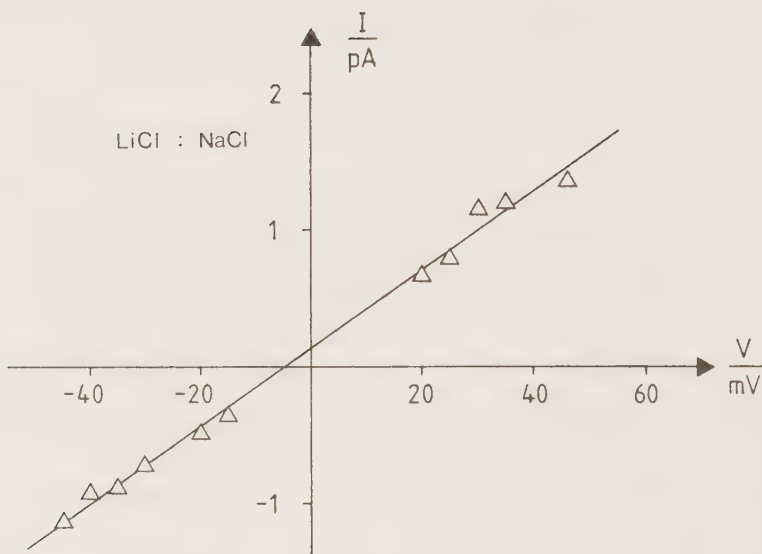


Abb. 3.27: Bestimmung des Permeabilitätsverhältnisses des Phalloporinkanals für Li^+ - und Cl^- bzw. für Na^+ - und Li^+ -Ionen durch Bestimmung des Umkehrpotentials bei asymmetrischen ionalen Bedingungen.

cis-Kompartiment: 1 M NaCl; 10 mM Tris-acetat, pH 7.0

trans-Kompartiment: 1 M LiCl; 10 mM Tris-acetat, pH 7.0

Die Spannungswerte wurden mit dem Elektrodenpotential korrigiert, das wegen der unterschiedlichen Cl^- -Aktivitäten entstand (vergl. Abb. 3.26). Das Umkehrpotential E_{rev} liegt unter diesen Bedingungen bei -5 mV und zeigt mit seinem negativen Vorzeichen eine leichte Bevorzugung des Phalloporinkanals für Na^+ gegenüber Li^+ als Transferion an. Nähere Erläuterungen s. Text.

Der Einbau des Phalloporinkanals erfolgte bei einem pH-Wert von 5.0, danach wurde der pH-Wert durch Zugabe einer entsprechenden Menge Tris auf beiden Seiten auf pH 7.0 eingestellt.

Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPE; Cholesterol (7:2:1)

Das Permeabilitätsverhältnis $b_{\text{Na/Li}}$ des Phalloporinkanals zwischen Na^+ - und Li^+ -Ionen ist somit geringer als das zwischen Na^+ - und Cl^- -Ionen. Die Diskriminierung zwischen den monovalenten Kationen Na^+ und Li^+ ist somit nicht so stark wie zwischen monovalenten Kationen und Cl^- als Anion.

3.1.4.3 Permeabilitätsverhältnisse des Phalloporinkanals zwischen Na^+ und den zweiwertigen Kationen Ca^{++} , Ba^{++} und Mg^{++}

Das Permeabilitätsverhältnis des Phalloporinkanals zwischen dem monovalenten Na^+ -Ion und divalenten Kationen läßt sich analog zu den Kapiteln 3.1.4.1 und 3.1.4.2 bestimmen, wenn ein Kompartiment eine NaCl -Lösung, das andere eine Lösung eines Chloridsalzes des betreffenden zweiwertigen Kations enthält. In diesem Fall läßt sich das Permeabilitätsverhältnis am genauesten mit Hilfe der Nernst-Planck-Gleichung berechnen (Kap. 6.3). Die Abb. 3.28 zeigt die Strom-Spannungs-Kurven individueller Phalloporinkanäle, wobei auf der cis-Seite jeweils eine NaCl - und auf der trans-Seite eine CaCl_2 -, BaCl_2 - bzw. MgCl_2 -Lösung vorhanden war. Hat der Phalloporinkanal unterschiedliche Permeabilitäten für Na^+ und zweiwertige Erdalkaliionen, so kommt es hier zur Ausbildung von Umkehrpotentialen E_{rev} , bei denen der Einzelkanalstrom verschwindet. Diese Umkehrpotentiale lassen sich wieder als Schnittpunkte mit der V-Achse bestimmen und liefern bei dem bekannten Wert von $b_{\text{Na/Cl}}$ jeweils die Permeabilitätsverhältnisse zwischen Ca^{++} -, Ba^{++} -, bzw. Mg^{++} -Ionen auf der einen und Cl^- -Ionen auf der anderen Seite. Hiermit lassen sich dann die Permeabilitätsverhältnisse zwischen diesen Erdalkaliionen und dem monovalenten Na^+ berechnen (Gl. 6.29).

Die Tabelle 3.1 zeigt die gemessenen Umkehrpotentiale und die mit der Nernst-Planck-Gleichung berechneten Permeabilitätsverhältnisse.

Der Phalloporinkanal ist demnach auch permeabel für die zweiwertigen Erdalkaliionen, jedoch in geringerem Maße als für die einwertigen Li^+ - und Na^+ -Ionen. Dabei weist er auch wie bei den Alkaliionen unter den Erdalkaliionen keine sehr hohe Selektivität auf; die relativen Permeabilitäten der am meisten und am wenigsten permeablen zweiwertigen Kationen (Mg^{++} und Ba^{++}) unterscheiden sich nur um einen Faktor von etwa 2.

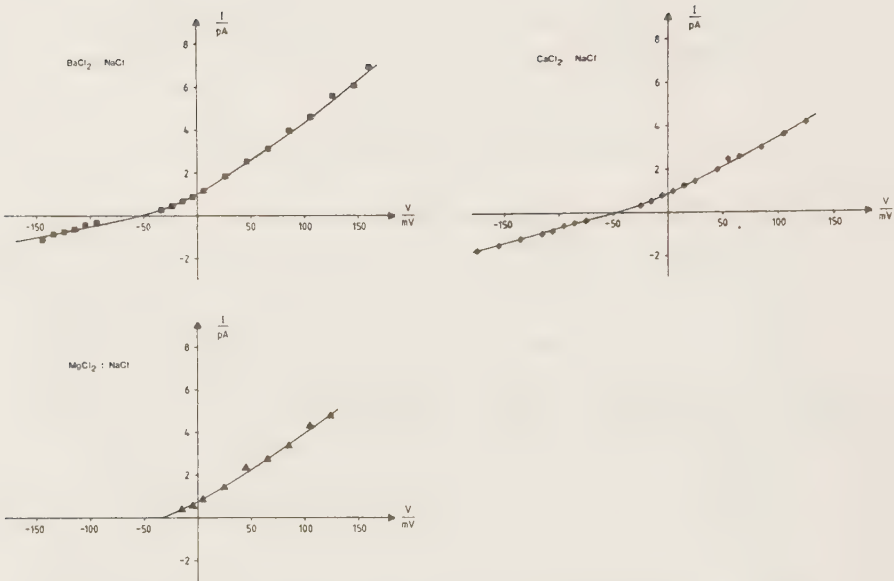


Abb. 3.28: Die Strom-Spannungs-Kennlinien von individuellen Phalloporinkanälen unter asymmetrischen Ionenbedingungen. Das cis-Kompartiment enthielt jeweils eine NaCl-Lösung, das trans-Kompartiment eine Lösung des Chloridsalzes von Ca^{++} , Ba^{++} bzw. Mg^{++} . Unter diesen Bedingungen ergibt sich aufgrund der unterschiedlichen Permeabilitäten des Phalloporinkanals für Na^+ und diesen zweiwertigen Erdalkaliionen ein Umkehrpotential E_{rev} , bei dem der Einzelkanalstrom verschwindet. Mit Hilfe der Nernst-Planck-Gleichung läßt sich indirekt das Permeabilitätsverhältnis zwischen Na^+ und den zweiwertigen Erdalkaliionen berechnen. Die Umkehrpotentiale und die Permeabilitätsverhältnisse sind in Tab. 3.1 aufgeführt.

Die Spannungswerte in den Diagrammen wurden jeweils mit dem Elektrodenpotential korrigiert, das wegen der unterschiedlichen Cl^- -Aktivitäten an den Ag-AgCl-Elektroden auftrat.

Elektrolytlösungen: 1.0 M NaCl; 10 mM Tris-acetat, pH 7.0 (cis)
0.5 M CaCl_2 (BaCl_2 ; MgCl_2); 10 mM Tris-acetat, pH 7.0 (trans)

Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPE; Cholesterol (7:2:1)

Der Einbau der Phalloporineinzelkanäle erfolgte zu Beginn bei pH 5.0, danach wurde der pH-Wert durch Zugabe einer entsprechenden Menge einer Tris-Stammlösung auf pH 7.0 eingestellt.

Erdalkalikation v^{++}	E_{rev}	$P_{v^{++}}$	$\frac{P_{Na^+}}{P_{v^{++}}}$
	mV	P_{Cl^-}	
Ca^{++}	-48	7.2	8.6
Ba^{++}	-53	6.4	9.7
Mg^{++}	-32	13.2	4.7

Tab. 3.1: Die in Abb. 3.28 experimentell bestimmten Umkehrpotentiale bei den asymmetrischen ionalen Bedingungen (cis: Na^+ -Ionen; trans: zweiwertige Erdalkaliionen v^{++}). Die Umkehrpotentiale ergeben sich als die Schnittpunkte der Einzelkanal-Strom-Spannungs-Kurven mit der V-Achse. Der Schnittpunkt der $Na^+ : Mg^{++}$ -Kurve wurde durch Kurvenextrapolation ermittelt. Bei einem bekannten $Na^+ : Cl^-$ -Permeabilitätsverhältnis von 62 lassen sich mit Hilfe der Nernst-Planck-Gleichung die Permeabilitätsverhältnisse zwischen Erdalkalikation und Cl^- -Ion direkt, und die Permeabilitätsverhältnisse zwischen Na^+ - und Erdalkalikation indirekt angeben (s. Kap. 6.3).

3.1.4.4 Der Einzelkanalleitwert des Phalloporins bei unterschiedlichen Elektrolytleitfähigkeiten

Der Einzelkanalleitwert Λ des Phalloporinkanals ist abhängig von der Ionenkonzentration der verwendeten Elektrolytlösung. Dies veranschaulicht die Abb. 3.29a. Λ wächst mit steigender KCl-Konzentration an, ohne jedoch in dem untersuchten Konzentrationsbereich (bis 1000 mM KCl) einen Sättigungswert zu erreichen.

Die Abb. 3.29b zeigt in einer doppeltlogarithmischen Darstellung, wie sich der Einzelkanalleitwert Λ des Phalloporins mit der Leitfähigkeit σ der verwendeten Elektrolytlösung ändert. σ hängt von den Ionenaktivitäten ab. Auch bei hohen Leitfähigkeiten, also in hoch konzentrierten Elektrolytlösungen, läßt der Phalloporinkanale mit seinem Leitwert kein Sättigungsverhalten erkennen. Vielmehr lassen sich die Datenpunkte mit guter Näherung durch eine Gerade anpassen, deren Steigung in der doppeltlogarithmischen Auftragung 0,95 beträgt. Das Verhalten läßt sich also formal durch die Beziehung

$$\Lambda \sim \sigma^{0.95} \approx \sigma \quad (\text{Gl. 3.16})$$

beschreiben. Der Einzelkanalleitwert des Phalloporins ist somit direkt proportional zu der Leitfähigkeit der verwendeten Elektrolytlösung. Dieser Befund weist darauf hin, daß das Lumen des Phalloporinkanals mit wäßriger Elektrolytlösung gefüllt ist.

3.1.4.5 Die pH-Abhängigkeit des Einzelkanalleitwertes

Die Abb. 3.30 zeigt den Einzelkanalleitwert des Phalloporins bei unterschiedlichen pH-Werten der Elektrolytlösung (1 M NaCl) im pH-Bereich 4-9.

Im pH-Bereich 6-9 kann der Einzelkanalleitwert als weitgehend konstant angesehen werden, er erreicht hier einen Mittelwert von 62 pS. Bei pH-Werten <5,5 verringert sich allerdings der Wert und fällt bei pH 4,0 auf 44 pS ab. Dies entspricht 71 Prozent des Leitwertes im basischen Milieu.

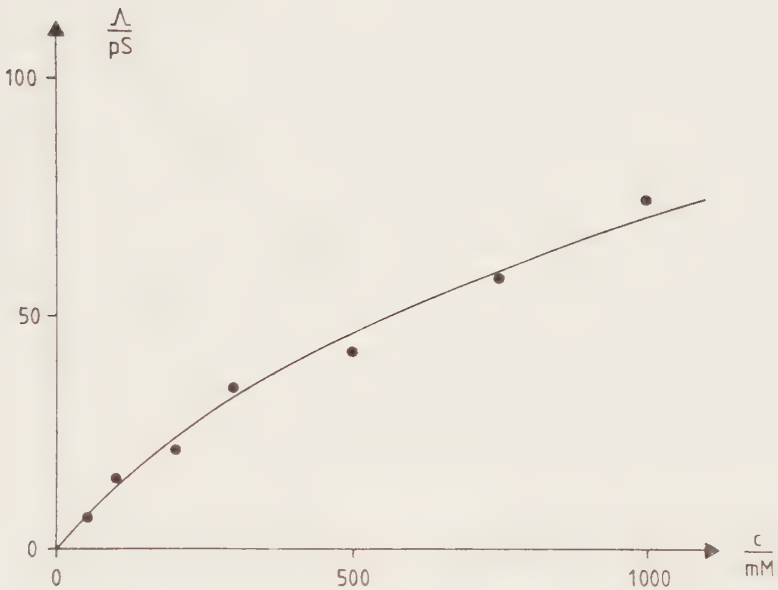


Abb. 3.29a: Der Einzelkanalleitwert Δ des Phalloporinkanals in Abhängigkeit von der KCl-Konzentration c der Elektrolytlösung. In dem untersuchten Konzentrationsbereich nimmt Δ keinen Maximal- oder Sättigungswert an. In einer 1-M-KCl-Lösung erreicht das Phalloporin einen Leitwert von $\Delta = 75$ pS. Δ wurde jeweils als die mittlere Steigung einer Strom-Spannungskennlinie im Spannungsbereich von -140 mV bis $+140$ mV eines individuellen Kanals bestimmt. Zusätzlich zu der variablen KCl-Konzentration enthielten die Elektrolytlösungen eine konstante Konzentration an CaCl_2 (10 mM) und Hepes (10 mM, pH 7.0). Ca^{++} wurde verwendet, um die durch das negativ geladene 1,2-DOPS entstehende Oberflächenladung abzuschirmen. Der Beitrag des CaCl_2 zum Einzelkanalleitwert wurde wegen der geringen Ca^{++} - und Cl^- -Permeabilität des Phalloporinkanals (Kap. 3.1.4.3) vernachlässigt. Der Einbau von Phalloporinkanälen erfolgte durch die Spannungssprungmethode (Kap. 3.1.1.1).

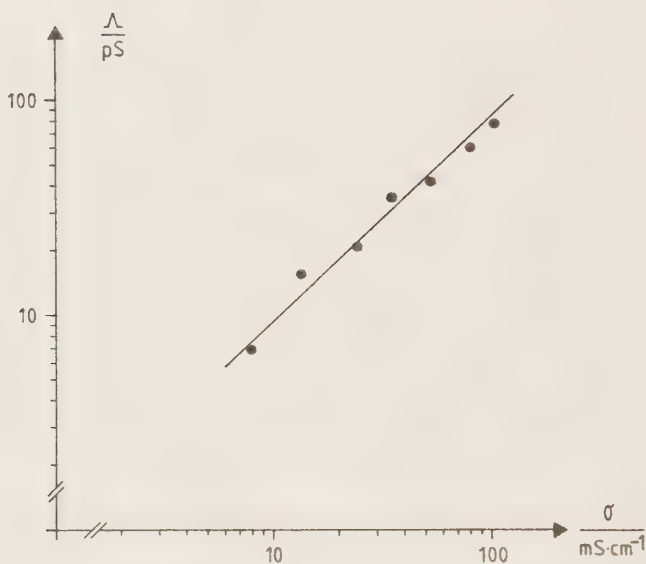


Abb. 3.29b: Der Einzelkanalleitwert Λ des Phalloporins in Abhängigkeit von der Leitfähigkeit σ der Elektrolytlösung in doppeltlogarithmischer Darstellung. Λ wurde jeweils als die mittlere Steigung einer Strom-Spannungskennlinie im Spannungsbereich von -140 mV bis $+140$ mV eines individuellen Kanals bestimmt. Für die Messungen wurden KCl-Lösungen folgender Zusammensetzung verwendet:

x mM KCl; 10 mM CaCl_2 ; 10 mM Hepes, pH 7.0

Die Konzentrationen x an KCl betragen (in mM): 50; 100; 200; 300; 500; 750; 1000.

Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPS; Cholesterol (7:2:1)

Alle Lösungen enthielten Ca^{++} , um die durch das negativ geladene 1,2-DOPS entstehende Oberflächenladung abzuschirmen.

Der Einbau einzelner Kanäle erfolgte durch die Spannungssprungmethode (Kap. 3.1.1.1).

Die Steigung der Geraden beträgt in logarithmischen Einheiten 0.95.

Die Steigung in einer linearen Auftragung beträgt $\Lambda / \sigma = 0.8 \cdot 10^{-11}$ m.

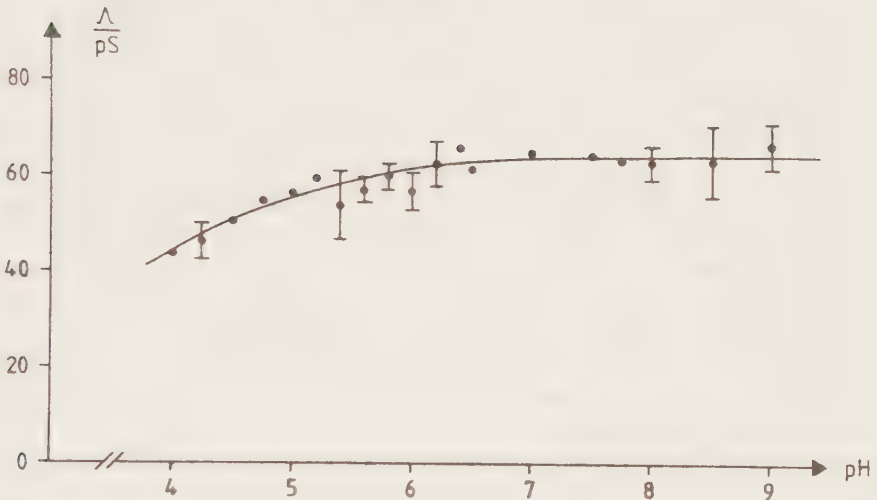


Abb. 3.30: Die pH-Abhängigkeit des Einzelkanalleitwertes Λ des Phalloporins. Im pH-Bereich 6-9 wird ein relativ konstanter Leitwert von 62 pS eingehalten. Bei pH-Werten < 5.5 kommt es dagegen zu einer leichten Abnahme des Leitwertes, er ist bei pH 4.0 ($\Lambda = 44$ pS) auf 71 Prozent des Maximalwertes herabgesetzt.

Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPS; Cholesterol (7:2:1)

Elektrolyttlösung: 1 M NaCl; 10 mM Puffer

verwendete Puffer: pH 4.0-5.6; pH 7.5-9.0: Tris-acetat

pH 5.6-6.4: Mes

pH 7.0: Hepes

3.1.4.6 Ein zweiter Kanaltypus in Proteinextrakten von *A. phalloides*

Verwendet man grob aufgereinigte Proteinpräparationen aus *A. phalloides*, so läßt sich das Auftreten eines zweiten Kanaltypus beobachten, der sich in seinen Eigenschaften vom Phalloporin deutlich unterscheidet. Gibt man zu einer Lipidmembran eine Lösung eines ammoniumsulfatgefällten Proteinextraktes, so zeigen sich vor allem bei neutralen und basischen pH-Werten, bei denen es zu keiner spontanen Aktivität des Phalloporins kommt (Kap. 3.1.1.1), nach einer Verzögerungszeit von wenigen Minuten charakteristische Stromfluktuationen, die in Abb. 3.31 dargestellt sind. Ein besonderes Merkmal dieses zweiten Kanaltypus ist, daß im Gegensatz zum Phalloporinkanal nicht nur ein, sondern zwei leitende Zustände (α und β) angenommen werden. Während einer Folge von Offenereignissen kann der Kanal zwischen diesen beiden Stufen hin- und herfluktuieren, bevor er wieder schließt. Die Verweildauern in den jeweiligen Zuständen betragen nur wenige Millisekunden, die Gesamtdauer der Folgen von Offenereignissen selbst wenige hundert Millisekunden.

Das statistisch signifikante gemeinsame Auftreten zweier Leitwertzustände innerhalb einer Folge von Offenereignissen zeigt, daß die beiden Leitwertstufen α und β nur einem einzigen Kanalkomplex zuzuordnen sind und nicht Offenereignisse zweier unabhängiger Kanaltypen repräsentieren.

Der Leitwert der α -Stufe beträgt 13 pS, der der β -Stufe 33 pS, also etwas mehr als das Doppelte. Die Geschlossenzeiten zwischen den Offenereignissen nehmen im Laufe der Zeit nach Beginn des Auftretens immer mehr zu, bis die Aktivität nach etwa 20-30 Minuten gänzlich aufhört. Im Gegensatz zum Phalloporin inaktiviert dieser zweite Kanaltypus irreversibel.

Zudem konnte weder eine pH- noch eine Spannungsabhängigkeit sowohl der Schaltkinetik als auch des Einbauverhaltens beobachtet werden. Die mittleren Offen- und Geschlossenzeiten bei pH 7 und pH 5 sind weitgehend identisch.

Die Einbaurrate dieses Kanaltypus ist, verglichen mit der Einbaurrate des Phalloporins bei sauren pH-Werten, gering, bei pH 7.0 ließen sich in den durchgeführten Experimenten mit ammoniumsulfatgefällten Proteinextrakten die Stromfluktuationen von höchstens 3-4 dieser Kanäle gleichzeitig beobachten.

Die nach einigen Minuten auftretende Inaktivierung, die niedrigeren Leitwerte, die relativ langen Geschlossenzeiten zwischen den Offenereignissen

sowie die relativ schnelle Kinetik erlauben es, den Beitrag dieses zweiten Kanaltypus aus *A. phalloides* zum gesamten Membranstrom einer phalloporinhaltigen Membran mit mehreren hundert Einzelkanälen zu vernachlässigen. Selbst bei Applikation geringer Mengen abgetropfter Gewebeflüssigkeit auf getauter Pilzchargen zu einem vorgeformten Lipidbilayer bei niedrigen pH-Werten kommt es zu einem Leitfähigkeitsanstieg mit einheitlichen Stufenhöhen, wie sie in Abb. 3.3c dargestellt sind. Dies veranschaulicht, daß das Phalloporin als ein wasserlösliches Protein bei weitem den Hauptanteil der leitfähigkeitserhöhenden Wirkung trägt.



Abb. 3.31: Ein zweiter Kanaltyp in Proteinextrakten aus *Amanita phalloides*. Nach Applikation einer Lösung eines ammoniumsulfatgefällten Proteinextrakts auf die cis-Seite der Lipidmembran (Endkonzentration 56 ng Protein/ml) läßt sich das Auftreten von Stromfluktuationen eines zweiten Kanaltyps beobachten. Der pH-Wert der Elektrolytlösung lag bei 7.0, so daß es zu keinem Spontaneinbau von Phalloporin kam. Charakteristisch für diesen zweiten gefundenen Kanaltyp ist das Fluktuieren zwischen zwei leitenden Zuständen α und β (13 und 33 pS). Das Einbauverhalten und die Schaltkinetik ist im Gegensatz zum Phalloporin nicht spannungs- und pH-abhängig.

Elektrolytlösung: 1 M NaCl; 10 mM Tris-acetat, pH 7.0

Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPE; Cholesterol (7:2:1)

Membranspannung: -150 mV

3.2 Rubescensporin

3.2.1 Einbau in planare Lipidmembranen

Gibt man geringe Mengen an Rubescensporin zu einem Lipidbilayer, so kommt es nach einer Verzögerungszeit t_{lag} bei einer angelegten Spannung von -100 mV zu einem drastischen Anstieg des Membranstroms (Abb. 3.32). Das niedrige Stromniveau vor der Zugabe zeigt die niedrige Leitfähigkeit der reinen, undotierten Lipidmembran an ($\approx 10^{-8}$ S/cm²). Etwa 2 min nach der Zugabe des Rubescensporins (Endkonzentration 0.86 µg Protein/ml) beginnt der Anstieg des Membranstroms, der die Erhöhung der Membranleitfähigkeit reflektiert. Nach weiteren 10 min beträgt der Membranstrom I_{10} etwa 35 µA/cm², was einer Membranleitfähigkeit von $3.5 \cdot 10^{-4}$ S/cm² entspricht.

Rubescensporin vermag also wie das Phalloporin die Membranleitfähigkeit innerhalb weniger Minuten um mehrere Größenordnungen zu erhöhen (s. Kap. 3.1.1.2). Anders als beim Phalloporin (Abb. 3.4) verläuft der durch Rubescensporin induzierte Stromzuwachs jedoch zunehmend schneller, ein Endwert wird unter den hier gewählten Bedingungen nicht erreicht.

Die Abb. 3.33 zeigt die zeitabhängige Zunahme des Membranstroms nach Zugabe von Rubescensporin in einer halblogarithmischen Auftragung. Nach einer "Einlaufzeit" von etwa 4 min nach Beginn der Stromzunahme lassen sich die Datenpunkte in dieser Auftragung gut mit einer Geraden annähern. Deshalb kann die Stromzunahme zeitlich entfernt vom Beginn der ersten Kanalaktivität formal als ein einfach exponentieller Prozeß beschrieben werden:

$$I \sim e^{t/\tau} \quad (Gl. 3.17)$$

Die Zeitkonstante τ ist der Zeitraum, in dem der Membranstrom auf das e-fache ansteigt. Der Wert von τ läßt sich in der halblogarithmischen Stromauftragung aus der Steigung der Geraden ermitteln. τ ist somit ein Parameter, der die zeitabhängige Erhöhung der Membranleitfähigkeit durch Rubescensporin charakterisiert.

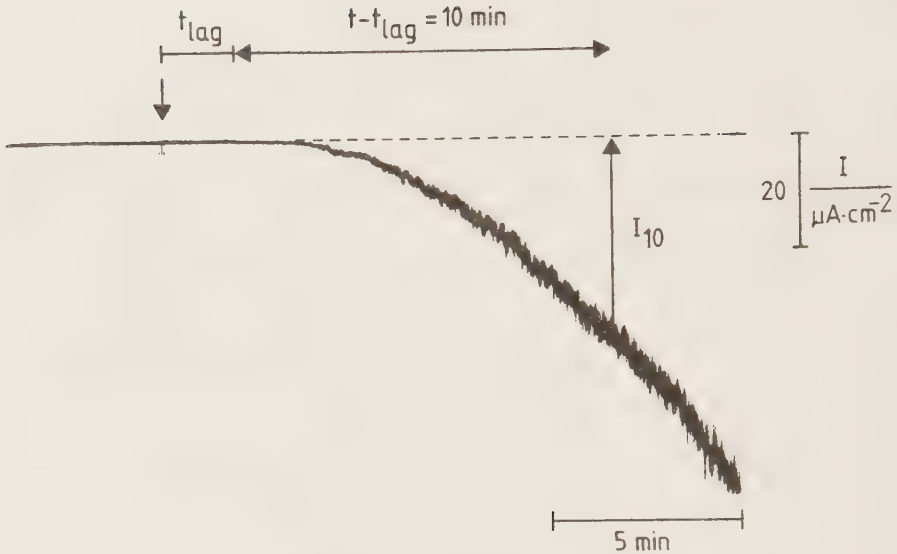


Abb. 3.32: Die Zunahme des Membranstroms durch eine Lipidmembran nach Zugabe von Rubescensporin. Der Beginn der Stromspur markiert die niedrige Leitfähigkeit der reinen, undotierten Membran ($\approx 10^{-8} \text{ S/cm}^2$) bei einer konstanten angelegten Spannung von -100 mV . Etwa 2 min nach Zugabe von Rubescensporin (senkrechter Pfeil nach unten) beginnt die Zunahme des Membranstroms, die Stromkurve verläuft entsprechend der Vorzeichenkonvention nach unten. Die Fortführung der Nulllinie ist gestrichelt eingezeichnet. Der nach weiteren 10 min ($t - t_{lag} = 10 \text{ min}$) angenommene Stromwert $I_{10} = 35 \mu A/cm^2$ entspricht einer Membranleitfähigkeit von nunmehr $350 \mu S/cm^2$.

Elektrolytlösung: 1 M NaCl; 10 mM Hepes, pH 7.0

Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPS; Cholesterol (7:2:1)

Proteinkonzentration: 0.86 $\mu g/ml$ (cis)

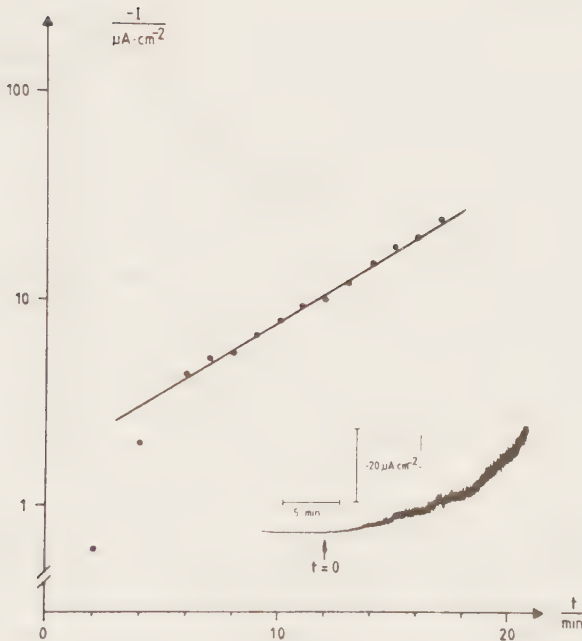


Abb. 3.33: Halblogarithmische Auftragung der Stromzunahme durch eine rubescensporindotierte Lipidmembran. Die negativen Stromwerte wurden der Übersichtlichkeit halber nach oben aufgetragen. Der Inset zeigt die entsprechende Originalregistrierung der Stromspur. Als Zeitpunkt $t = 0$ wurde der Beginn der Kanalaktivität gewählt (Pfeil). Die Verzögerungszeit beträgt etwa 3 min. In der Einlaufphase kommt es zu einem zunächst steilen Anwachsen des Stromes, nach etwa 4 min wird ein in der halblogarithmischen Auftragung geradliniger Verlauf angenommen. Die Leitfähigkeitserhöhung der Lipidmembran durch Rubescensporin läßt sich demnach als ein einfach exponentieller Prozeß mit einer Zeitkonstanten τ beschreiben. Der aus der Geradensteigung ermittelte Wert für τ in diesem Beispiel beträgt 6.3 min.

Elektrolytlösung: 1 M NaCl; 10 mM Hepes, pH 7.0

Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPS; Cholesterol (7:2:1)

Membranspannung: -100 mV

Proteinkonzentration: 0.86 $\mu\text{g}/\text{ml}$

3.2.1.1 Die Spannungsabhängigkeit des Vielkanaleinbaus

Die Abb. 3.32 und 3.33 zeigen den Vielkanaleinbau von Rubescensporin jeweils bei einer angelegten Spannung von -100 mV. Abb. 3.34 stellt die entsprechenden Stromzuwachskurven bei drei verschiedenen negativen Spannungen, aber bei derselben Rubescensporinkonzentration (0.86 µg Protein /ml) auf der cis-Seite dar. Bei -50 mV verläuft der exponentielle Zuwachs relativ langsam, die Zeitkonstante τ beträgt 11.3 min. Mit zunehmend negativ werdender Spannung beschleunigt sich allerdings der Prozeß (-90 mV: τ = 5.1 min; -140 mV: τ = 1.2 min). Hohe negative Membranspannungen fördern somit den Prozeß der Leitfähigkeitserhöhung durch Rubescensporin, während niedrige negative Spannungen ihn verlangsamen. Diese Spannungsabhängigkeit der durch Rubescensporin bewirkten Leitfähigkeitszunahme kommt in der Spannungsabhängigkeit der Zeitkonstanten τ für den exponentiellen Stromanstieg zum Ausdruck. In Abb. 3.35a ist τ in Abhängigkeit von der angelegten Membranspannung aufgetragen. Ausgehend von dem Mittelwert für τ von 12.4 min bei -50 mV nimmt der Wert der Zeitkonstanten zu höher negativen Werten ab, bei -160 mV beträgt τ = 0.5 min, d.h. es kommt zu einer Beschleunigung des Prozesses innerhalb dieses Spannungsbereiches um das etwa 25fache! Die Abb. 3.35b zeigt eine halblogarithmische Darstellung der Spannungsabhängigkeit von τ . Dieser liegt eine Beziehung der Form

$$\tau \sim e^{-zF(V - V_0)/RT} \quad (Gl. 3.18)$$

zugrunde. Die Datenpunkte lassen sich durch zwei Geraden unterschiedlicher Steigung anpassen. Dies deutet darauf hin, daß die Kanalbildung durch Rubescensporin (mindestens) zwei spannungsabhängige Prozesse umfaßt, die sich durch unterschiedlich große Schaltladungen (gating charges) und damit unterschiedliche Steilheiten ihrer Spannungsabhängigkeit auszeichnen. Die Größe ihrer jeweiligen Schaltladungen kann aus den Steigungen der Anpassungsgeraden entnommen werden. Bei Spannungen von $V < -110$ mV überwiegt ein stärker spannungsabhängiger Prozeß mit einer Schaltladung von 1.2, während im Spannungsbereich zwischen -110 mV und -50 mV ein schwächer spannungsabhängiger Prozeß zum Tragen kommt, dessen Schaltladung nur etwa 0.36 beträgt. Diese beiden Abhängigkeiten könnten auf zwei unterschiedlichen Orientierungsprozessen von Proteinmolekülen mit unterschiedlich starken Spannungsabhängigkeiten beruhen.

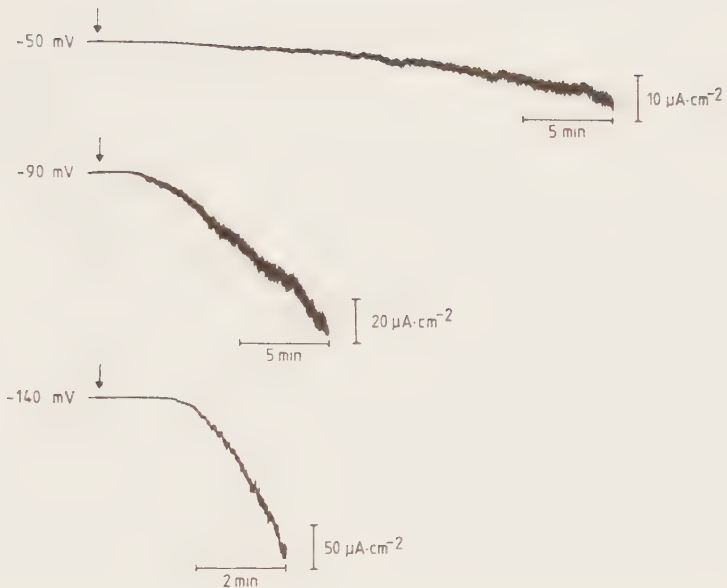


Abb. 3.34: Erhöhung der Membranleitfähigkeit durch Rubescensporin bei drei verschiedenen negativen Membranspannungen. Die Geschwindigkeit des Stromzuwachses nimmt mit stärker negativ werdender Spannung zu. Die Zeitkonstanten τ der exponentiellen Zuwachsprozesse betragen

bei -50 mV: 11.3 min

bei -90 mV: 5.1 min

bei -140 mV: 1.2 min

Elektrolytlösung: 1 M NaCl; 10 mM Hepes, pH 7.0

Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPS; Cholesterol (7:2:1)

Proteinkonzentration: 0.86 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (cis)

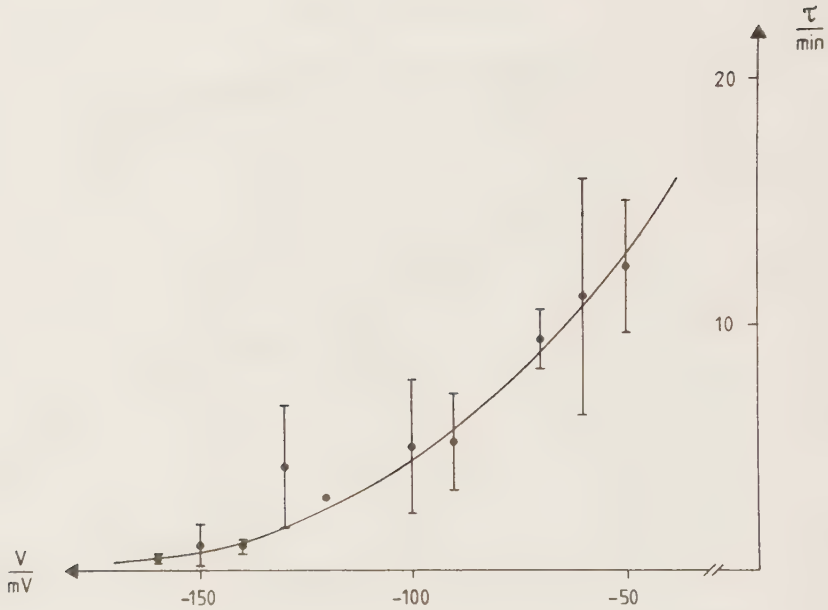


Abb. 3.35a: Die Zeitkonstanten τ der durch Rubescensporin induzierten exponentiellen Membranstromzunahme in Abhängigkeit von der angelegten Membranspannung V . Innerhalb des dargestellten Spannungsbereiches (-50 mV bis -160 mV) nimmt die Zeitkonstante τ des exponentiellen Stromanstiegs in Richtung zu höher negativen Spannungen um einen Faktor von etwa 25 ab. Experimentelle Bedingungen s. Abb. 3.33.

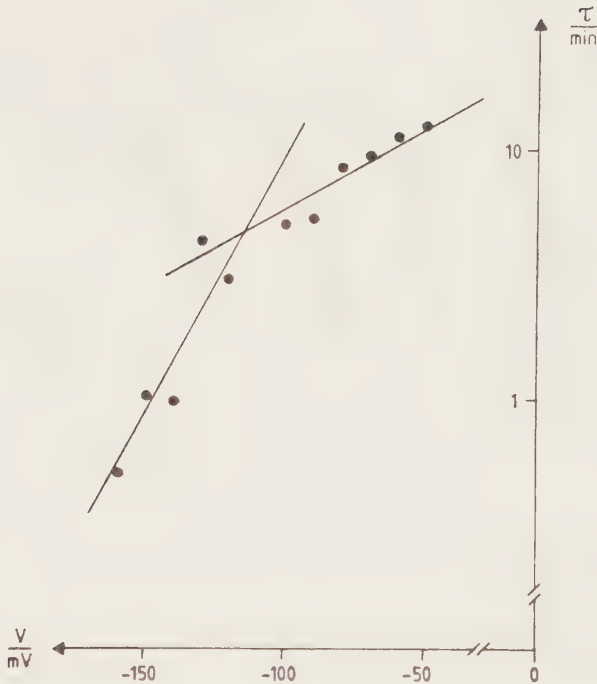


Abb. 3.35b: Halblogarithmische Auftragung der Zeitkonstanten τ der durch Rubescensporin induzierten exponentiellen Membranstromzunahme in Abhängigkeit von der Membranspannung V gemäß Gl. 3.18. Der Kanalbildung durch Rubescensporin können mindestens zwei spannungsabhängige Prozesse zugeordnet werden, die sich durch ihre Schaltladungen (gating charges) unterscheiden. Diese können nach der angegebenen Beziehung in dieser Auftragung aus den Steigungen der Geraden berechnet werden. Bei Spannungen von -110 mV und negativer überwiegt ein Prozeß mit einer "steileren" Spannungsabhängigkeit und einer größeren Schaltladung von etwa 1.2 in Einheiten von $RT/F = 25.4$ mV. Im Spannungsbereich von -110 mV bis -50 mV dominiert dagegen ein Prozeß, der durch eine "flachere" Spannungsabhängigkeit und eine entsprechend kleinere Schaltladung von 0.36 gekennzeichnet ist. Die Datenpunkte wurden aus der Abb. 3.35a übernommen. Die Fehlergrenzen wurden der Übersichtlichkeit halber fortgelassen. Experimentelle Bedingungen s. Abb. 3.33.

3.2.1.2 Inaktivierung der rubescensporininduzierten Membranleitfähigkeit durch hohe positive Membranspannungen

In Kap. 3.2.1.1 wurde dargestellt, daß die Leitfähigkeitserhöhung durch Rubescensporin bei höheren negativen Membranspannungen beschleunigt verläuft. Umgekehrt kommt es zu einer Verlangsamung in Richtung zu positiven Membranspannungen. Bei positiven Membranspannungen kann man dann sogar eine Reduktion einer bereits bei negativen Spannungen induzierten Membranleitfähigkeit erreichen. Die Abb. 3.36 stellt ein entsprechendes Experiment dar. Gezeigt ist der Stromfluß durch eine rubescensporindotierte Membran, alternierend bei -100 mV und +100 mV. Hat die Membran bei +100 mV zunächst die Leitfähigkeit des reinen, undotierten Bilayers, so kommt es unmittelbar nach dem Umschalten zu -100 mV zu einem drastischen Stromzuwachs. Wird die Polarität wieder gewechselt (+100 mV), so verschwindet die bereits erzeugte Membranleitfähigkeit innerhalb weniger hundert Millisekunden wieder. Dieser Aktivierungs-Inaktivierungs-Prozeß ist beliebig reversibel.

Zu beachten ist hierbei, daß unmittelbar nach dem Zurückschalten auf -100 mV nicht der zuvor bei -100 mV erreichte Stromwert angenommen wird, sondern der dem bei +100 mV nach der Inaktivierung entsprechende negative Stromwert. Es kommt dann erst wieder zu einem langsamen Anwachsen des Membranstroms. Bei positiven Spannungen schalten die leitfähigkeitserhöhenden Strukturen in der Membran offensichtlich ab und müssen sich bei negativen Spannungen erst wieder neu bilden.

3.2.1.3 Spannungssprungexperimente an rubescensporindotierten Lipidmembranen

Analog zu dem in Abb. 3.36 dargestellten Experiment kann man die an einer rubescensporindotierten Membran anliegende Spannung stufenweise ändern. Ausgehend von -100 mV wird die Spannung rechteckförmig auf andere Werte geändert, sobald die Leitfähigkeit auf ein Bezugsniveau gewachsen ist. Ein solches Spannungssprungexperiment zeigt die Abb. 3.37a. Von -100 mV ausgehende Sprünge zu positiven Spannungen führen in der erwähnten Weise (Kap. 3.2.1.2.) zu einem sehr schnellen, praktisch vollständigen Verschwinden der aufgebauten Leitfähigkeit.

Die Inaktivierung des Membranstroms nach einem Sprung zu einer positiveren Haltespannung läßt sich als ein einfach exponentieller Prozeß durch die

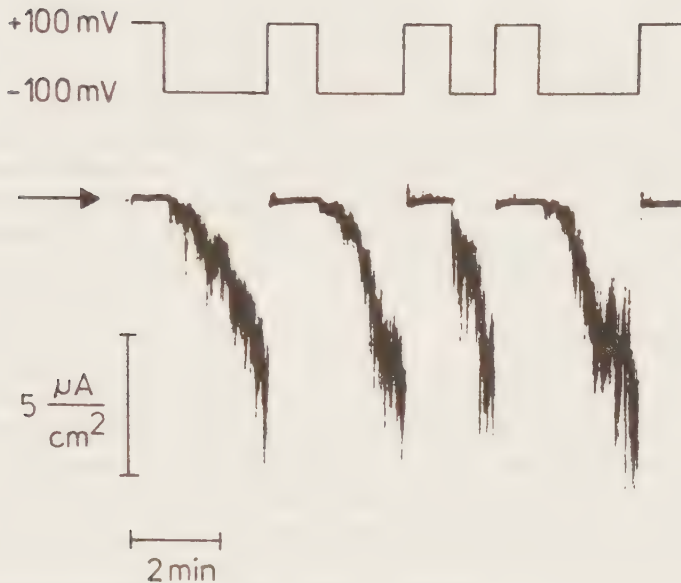


Abb. 3.36: Die Inaktivierung der durch Rubescensporin induzierten Membranleitfähigkeit durch hohe positive Membranspannungen. Gezeigt ist die Registrierung des Membranstroms alternierend bei +100 mV und -100 mV. Ströme bei +100 mV erfolgen als Registrierung nach oben, bei -100 mV entsprechend nach unten. Der waagerechte Pfeil markiert den Stromwert des reinen, undotierten Bilayers, der wegen der niedrigen Leitfähigkeit ($\approx 10^{-8} S/cm^2 = 10^{-9} A/cm^2$) nahezu Null ist. Die Zugabe von Rubescensporin ist nicht gezeigt. Bei +100 mV nimmt die rubescensporindotierte Membran praktisch die Leitfähigkeit des undotierten Bilayers an (Pfeil). Polaritätswechsel auf -100 mV führt zu dem beschriebenen Zuwachs des Membranstroms und somit der Membranleitfähigkeit. Abermalige Änderung (+100 mV) bewirkt nahezu vollständige Inaktivierung der induzierten Membranleitfähigkeit. Diese alternierende In- und Reaktivierung ist vollständig reversibel.
Elektrolytlösung: 1 M NaCl; 10 mM Tris-acetat, pH 7.0
Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-POPG; Ei-PE; Cholesterol (6:2:1:1)
Proteinkonzentration: 0.86 $\mu g/ml$

Beziehung

$$I(t) - I_{\infty} = (I_0 - I_{\infty}) e^{-t/\tau_i} \quad (\text{Gl. 3.19})$$

darstellen. Dabei ist $I(t)$ der Membranstrom zum Zeitpunkt t , I_0 der Stromwert zum Zeitpunkt $t = 0$ im Moment des Spannungssprungs und I_{∞} der stationäre Endwert des Membranstroms. τ_i ist die Zeitkonstante des Inaktivierungsprozesses. Die Abb. 3.37b zeigt ein Beispiel des Stromverlaufs nach einem Spannungssprung bei einer höheren Zeitauflösung. Die Datenpunkte wurden entsprechend der Beziehung

$$\frac{I(t) - I_{\infty}}{I_0 - I_{\infty}} = R_i \quad (\text{Gl. 3.20})$$

normiert. Die Zeitkonstante τ_i , die aus der Steigung der Anpassungsgeraden (Abb. 3.37b) berechnet werden kann, ist bei derartigen Spannungssprungexperimenten im Bereich von -100 mV bis $+100 \text{ mV}$ weitgehend konstant (Mittelwert: $1.0 \pm 0.5 \text{ s}$). Die Geschwindigkeit des Inaktivierungsprozesses ist daher nur wenig oder nicht spannungsabhängig.

Bei den Sprüngen zu -20 mV bis -80 mV (Abb. 3.37a) verschwindet die Leitfähigkeit nicht mehr vollständig, sondern der absolute Stromwert nimmt überproportional zu und ist nun deutlich größer als der Strom der reinen Lipidmembran.

Bei diesem Vergleich werden die Stromwerte vor und nach dem Spannungssprung nach Ablauf der schnellen Relaxation betrachtet. Die langsame Relaxation der Neubildung von Rubescensporinkanälen wird hierbei außer acht gelassen.

Abb. 3.37a macht ferner deutlich, warum die Aufnahme einer Strom-Spannungs-Kennlinie für eine rubescensporindotierte Membran auf die beim Phalloporin ausgeführte Weise nicht analog durchzuführen ist. Im Fall des Phalloporins wurde die Membranspannung von der Haltespannung 0 mV ausgehend rechteckförmig geändert und der resultierende Membranstrom registriert. Bei dieser Haltespannung (0 mV) wären jedoch die in der Membran vorhandenen Rubescensporinkanäle praktisch inaktiv (s. z.B. Abb. 3.37a). Deshalb wurde für rubescensporindotierte Membranen eine Haltespannung von -100 mV festgelegt, bei der eine hohe Leitfähigkeit zu erzielen ist. Trägt man die Verhältnisse I_V/I_{-100} (Stromwerte I_V nach dem Spannungssprung und der schnellen inaktivierenden Stromrelaxation dividiert durch den Bezugswert I_{-100} bei der Haltespannung -100 mV) gegen die Sprungspannung auf, so

erhält man eine "reduzierte" Strom-Spannungs-Kennlinie einer rubescensporindotierten Membran, wie sie in Abb. 3.38 dargestellt ist. Diese Kennlinie zeigt eine deutliche Gleichrichtercharakteristik: Membranströme treten nur bei negativen Membranspannungen auf, bei positiven Spannungen kommt es zu einer nahezu vollständigen Unterdrückung des Membranstroms. Diese I-V-Charakteristik bringt das Aktivierungs- und Inaktivierungsverhalten einer rubescensporindotierten Membran bei negativen und positiven Spannungen besonders deutlich zum Ausdruck.

Zu beachten ist außerdem, daß das Gleichrichterverhalten die entgegengesetzte Spannungspolarität zu der einer phalloporinhaltigen Membran aufweist (vergl. Abb. 3.15).

Analog zum Phalloporin läßt sich nun auch die spannungsabhängige Leitfähigkeit einer rubescensporindotierten Membran darstellen, wenn die Verhältnisse g_V/g_{-100} der durch $I_V/V = g_V$ und $I_{-100}/-100 \text{ mV} = g_{-100}$ definierten Membranleitfähigkeiten gegen die Sprungspannung V aufgetragen werden (Abb. 3.39). Auch hier kommt zum Ausdruck, daß hohe negative Membranspannungen die Leitfähigkeitserhöhung durch Rubescensporin induzieren, hohe positive Membranspannungen ihr jedoch entgegenwirken. Ein Vergleich mit der Leitfähigkeitskennlinie des Phalloporins (Abb. 3.16) zeigt wiederum die entgegengesetzte Spannungsabhängigkeit beider Kanalbildner.

3.2.1.4 Die Verzögerungszeit t_{lag}

Wie beim Phalloporin kommt es auch beim Rubescensporin zu einer Verzögerungszeit zwischen dem Zugabemoment des Kanalbildners zur wäßrigen Phase und dem Beginn der Leitfähigkeitserhöhung der Membran (Abb. 3.4 und 3.32). Diese Phase muß alle Prozesse umfassen wie Diffusion des Kanalbildners zur, Anlagerung und Inkorporation in die Membran sowie eventuelle weitere Prozesse bis zur aktiven Kanalstruktur. Die Abb. 3.40 zeigt, daß die Verzögerungszeit im Gegensatz zu der Zeitkonstanten τ des Stromanstiegs (Abb. 3.35) unabhängig von der angelegten Membranspannung ist. Das deutet darauf hin, daß die Verzögerungszeit zum größten Teil spannungsunabhängige Vorgänge wie Diffusion zur und Anlagerung an die Membran umfaßt.

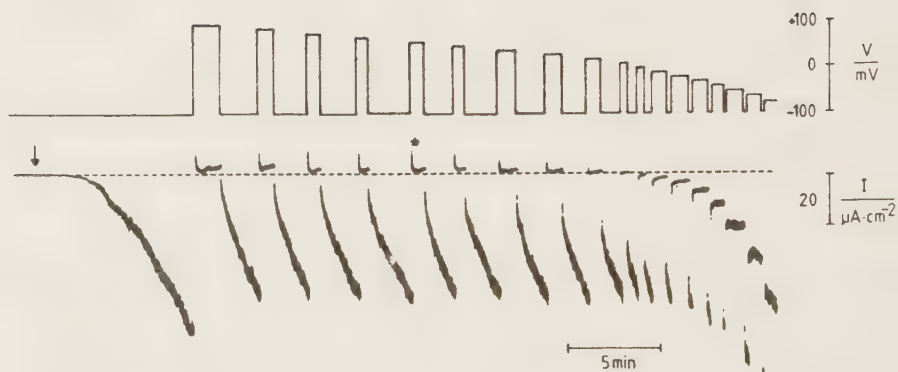


Abb. 3.37a: Spannungssprungexperimente an einer rubescensporindotierten Membran. Anders als beim Phalloporin (Haltespannung 0 mV) wurde für die Registrierung einer I-V-Kennlinie beim Rubescensporin eine Haltespannung von -100 mV gewählt, um eine ausreichend hohe Leitfähigkeit zu erreichen. Ausgehend von -100 mV wurde die Membranspannung sukzessiv auf andere Werte sprunghaft geändert (obere Spannungsspur) und die entstehenden Ströme registriert. Die untere Stromspur beginnt mit dem Membranstrom des undotierten Bilayers bei -100 mV, der Zugabe des Rubescensporins (Pfeil) und dem resultierenden Anstieg des Membranstroms. Spannungssprünge zu positiven Membranspannungen führen nach einem schnellen Relaxationsvorgang zu einer fast vollständigen Reduktion des Membranstroms auf den Wert des undotierten Bilayers (s. Anfang der Stromspur). Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Fortführung der Stromnulllinie. Die exponentiell abfallende Stromspitze unmittelbar nach dem Umschalten reflektiert den schnellen Inaktivierungsprozeß der Kanalstrukturen. Die mit einem Stern markierte Sprungkurve auf +60 mV ist in der nachfolgenden Abb. 3.37b zur Verdeutlichung des exponentiellen schnellen Inaktivierungsprozesses bei einer höheren Zeitauflösung gezeigt.

Elektrolytlösung: 1 M NaCl; 10 mM Hepes, pH 7.0
 Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPS; Cholesterol (7:2:1)
 Proteinkonzentration: 0.86 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (cis)

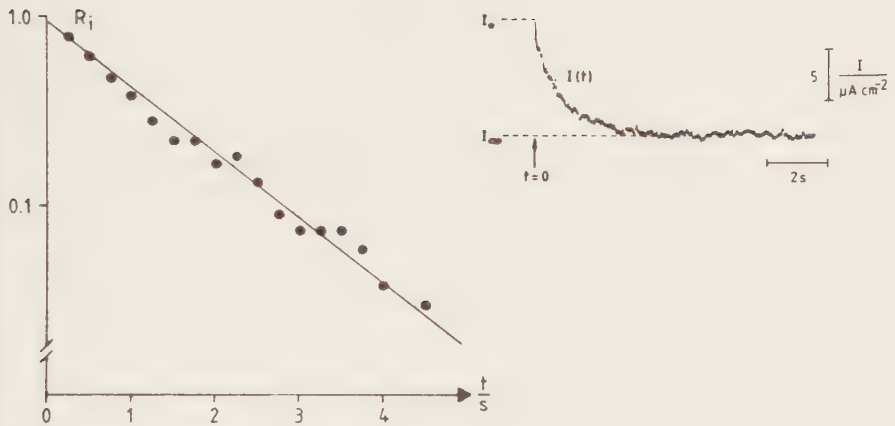


Abb. 3.37b: Halblogarithmische Darstellung des inaktivierenden Stroms einer rubescensporindotierten Membran. Gezeigt ist die mit einem Stern markierte Sprungkurve aus der Abb. 3.37a bei einer höheren Zeitauflösung. Zum Zeitpunkt $t = 0$ im Moment des Spannungswechsels von der Haltespannung -100 mV auf die Sprungspannung $+60$ mV nimmt der Membranstrom den Wert I_0 an und fällt mit der Zeit exponentiell ab, um schließlich einen stationären Endwert I_∞ anzunehmen (Bildeinschub rechts). Die Stromwerte wurden gemäß Gl. 3.20 korrigiert und sind im linken Abbildungsteil halblogarithmisch dargestellt. Der Kurvenverlauf läßt sich mit guter Näherung als ein einfach exponentieller Prozeß beschreiben. Die Zeitkonstante τ_i der Strominaktivierung beträgt in diesem Beispiel 1.28 s. Experimentelle Bedingungen s. Abb. 3.37a.

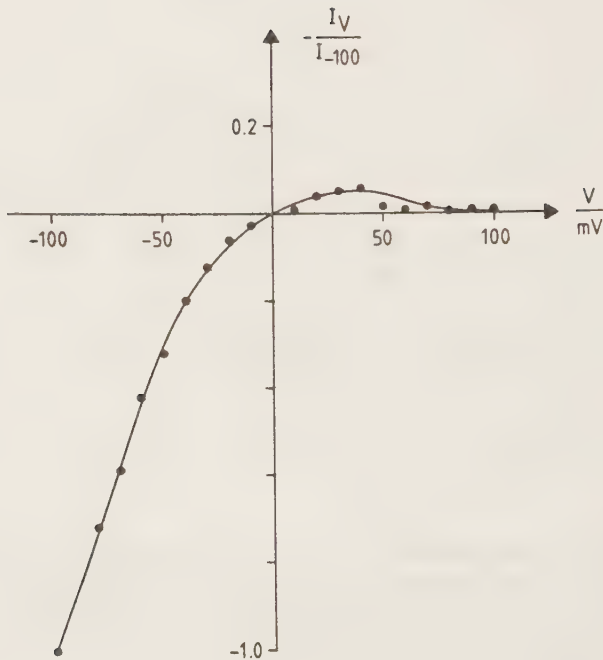


Abb. 3.38: Reduzierte Strom-Spannungs-Kennlinie von rubensporindotierten Membranen in Relation zum Stromwert I_{-100} bei -100 mV. Aufgetragen wurde das Verhältnis des Stromwertes nach dem Spannungssprung I_V zu dem bei der Haltespannung (-100 mV) I_{-100} gegen die jeweilige Sprungspannung V . Diese Verhältniswerte wurden zur Einhaltung der Vorzeichenkonvention (positive Ströme bei positiven Spannungen) mit -1 multipliziert. Die Registrierung der Stromwerte erfolgte auf die in Abb. 3.37a dargestellte Weise. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Nähere Erläuterungen s. Text. Experimentelle Bedingungen s. Abb. 3.37a.

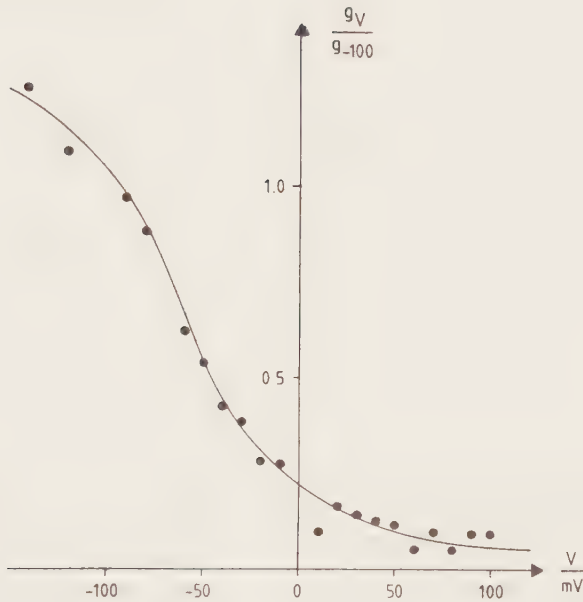


Abb. 3.39: Die Leitwert-Spannungs-Kennlinie von rubescensporindotierten Membranen. Aufgetragen ist das Verhältnis der Membranleitfähigkeiten g_V/g_{-100} mit $g_V = I_V/V$ und $g_{-100} = I_{-100}/-100$ mV gegen die jeweilige Sprungspannung V . Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Nähere Erläuterungen s. Text.
Experimentelle Bedingungen s. Abb. 3.37a.

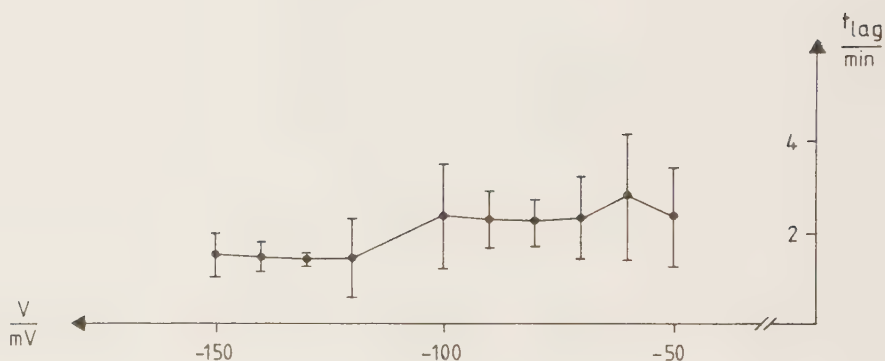


Abb. 3.40: Die Verzögerungszeit t_{lag} zwischen dem Zugabemoment von Rubescensporin und dem Beginn der Leitfähigkeitserhöhung in Abhängigkeit von der angelegten Einbauspaltung V . t_{lag} ist praktisch spannungsunabhängig. Dieser Parameter umfaßt hauptsächlich spannungsunabhängige Prozesse in der wäßrigen Phase wie Diffusion und Anlagerung an die Membran. Diese laufen unter den gewählten Bedingungen innerhalb von etwa 2 min ab.

Elektrolytlösung: 1 M NaCl; 10 mM Hepes, pH 7.0

Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPS; Cholesterol (7:2:1)

Proteinkonzentration: 0.86 $\mu\text{g/ml}$ (cis)

3.2.1.5 Die pH-Abhängigkeit des Vielkanaleinbaus

Der Vielkanaleinbau des Phalloporins zeigte eine starke pH-Abhängigkeit, die auf eine notwendige Protonierungsreaktion an der Kanalstruktur hindeutet (Kap. 3.1.1.2.5). Bei neutralen und basischen pH-Werten kommt es zu keinem Einbau von Phalloporin in Lipidmembranen.

Das Rubescensporin weist dagegen in seiner Einbaufähigkeit keine scharfe pH-Abhängigkeit auf. Die Abb. 3.41 zeigt exemplarisch das Einbauverhalten von Rubescensporin anhand dreier Einbaukurven im pH-Bereich von 4.25 bis 8.50. Sowohl bei sauren als auch bei basischen pH-Werten kommt es bei identischer Einbauspannung und Proteinkonzentration zu einer Erhöhung der Membranleitfähigkeit. Man beobachtet jedoch, daß die Zuwachsgeschwindigkeit des Membranstroms bei den sauren pH-Werten 4.25 und 5.50 abnehmend ist, während beim basischen pH-Wert 8.50 ein exponentiell ansteigendes Verhalten registriert wird.

Es ist zu erwähnen, daß die bei sauren pH-Werten registrierten Einbaukurven in ihrer Form grundsätzlich von der bisher beschriebenen Einbaucharakteristik des Rubescensporins abweichen. Bei nur schwach sauren pH-Werten ($5 < \text{pH} < 6$) wächst der Membranstrom nicht exponentiell mit der Zeit an, sondern durchläuft ähnlich wie beim Phalloporin (vergl. Abb. 3.4) anfänglich eine Phase maximaler Steigung, um dann langsamer zu werden. Nach etwa 25 min wird sogar – im Unterschied zum Phalloporin – ein stationärer Endwert erreicht.

Bei pH 4.25 läßt sich der Stromzuwachs ebenfalls nicht mehr als ein exponentieller Prozeß wie bei basischen und neutralen pH-Werten beschreiben. Die Zuwachsgeschwindigkeit nimmt mit der Zeit ab, es wird aber kein stationärer Endwert angenommen. Qualitativ sind die Einbaukurven des Rubescensporins bei stärker sauren pH-Werten ($\text{pH} < 5$) somit den Einbaukurven des Phalloporins ähnlicher.

3.2.1.6 Die Konzentrationsabhängigkeit des Vielkanaleinbaus

In Kap. 3.1.1.3 wurde die Abhängigkeit mehrerer Phalloporineinbauparameter von der eingesetzten Phalloporinkonzentration dargestellt. Wählt man für das Rubescensporin als Einbauparameter die Verzögerungszeit t_{lag} , den Stromwert I_{10} , der jeweils 10 min nach Beginn des Stromzuwachses erreicht wird (Abb. 3.32) und die Zeitkonstante τ des exponentiellen Stromanstiegs

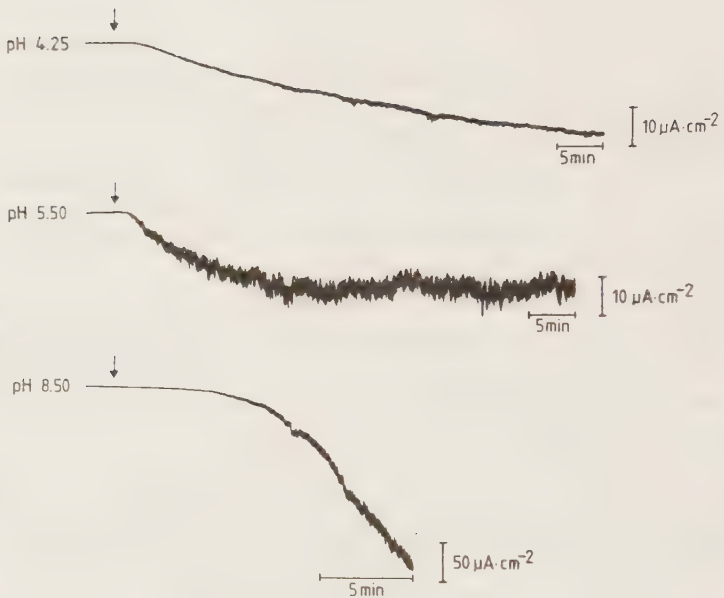


Abb. 3.41: Das Einbauverhalten des Rubescensporins in Lipidmembranen bei 3 verschiedenen pH-Werten. Im Gegensatz zum Phalloporin kommt es sowohl im sauren als auch basischen pH-Bereich zu einer spontanen Zunahme des Membranstroms (Registrierung nach unten) nach Zugabe von Rubescensporin (Pfeile). Die Stromspuren beginnen jeweils mit dem Membranstromniveau des noch undotierten Bilayers. Die Einbauspaltung und die Proteinkonzentration ist in allen Fällen identisch (-100 mV; 0.86 $\mu\text{g}/\text{ml}$, cis). Im basischen Milieu (pH 8.50) verläuft der Stromzuwachs deutlich schneller als im sauren. Bei den sauren pH-Werten steigt der Strom nicht mehr exponentiell mit der Zeit an, bei pH 5.5 wird ein zeitlich konstanter Endwert von etwa 23 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ erreicht.

Elektrolytlosung: 1 M NaCl; 10 mM Puffer

verwendete Puffer: Tris-acetat bei pH 4.25 und pH 8.50
Mes bei pH 5.5

Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPS; Cholesterol (7:2:1)

bei pH 7.0, so erhält man für deren Konzentrationsabhängigkeiten die in Abb. 3.42, 3.43 und 3.44 gezeigten Beziehungen.

Die Abb. 3.42 zeigt zunächst in doppeltlogarithmischer Auftragung die Verzögerungszeit t_{lag} in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration. Paßt man die Datenpunkte mit einer Geraden an, so erhält man mit guter Näherung eine Beziehung der Form:

$$t_{lag} \sim [\text{Protein}]^{-0.55} \quad (\text{Gl. 3.21})$$

Der Exponent von -0.55 ergibt sich aus der Steigung der Anpassungsgeraden. Die Abb. 3.43 zeigt die Zeitkonstante τ des exponentiellen Stromzuwachses als Funktion der eingesetzten Proteinkonzentration. τ nimmt mit zunehmender Proteinkonzentration ab, d.h. die Erhöhung der Membranleitfähigkeit verläuft umso schneller, je mehr Rubescensporin in der wäßrigen Phase vorhanden ist. Die Steigung der Anpassungsgeraden liefert in diesem Fall einen Wert von -0.6, so daß die Beziehung beschrieben werden kann als:

$$\tau \sim [\text{Protein}]^{-0.60} \quad (\text{Gl. 3.22})$$

Im Falle des Stromwertes I_{10} , der jeweils 10 min nach Beginn des Leitfähigkeitszuwachses angenommen wurde, folgen die Datenpunkte in der doppeltlogarithmischen Auftragung keiner linearen Beziehung. Die Kurve flacht zu geringeren Proteinkonzentrationen hin ab. Bei höheren Konzentrationen ($>10^{-7}$ g/ml) wächst I_{10} stärker als nur einfach linear an. Im Bereich 0.3-3.0 μg Protein/ml erhält man eine Steigung von +1.8.

3.2.1.7 Perfusionsexperimente an rubescensporindotierten Membranen

Perfundiert man die cis-Seite einer phalloporinhaltigen Lipidmembran, um den noch frei in der wäßrigen Phase vorhandenen Kanalbildner zu entfernen, so stoppt der Zuwachs des Membranstroms, und die Membranleitfähigkeit bleibt auf einem zeitlich konstanten Wert (Abb. 3.13). Dies trifft für das Rubescensporin jedoch nicht zu. Die Abb. 3.45 zeigt das Beispiel eines entsprechenden Perfusionsexperiments an einer rubescensporindotierten Lipidmembran. Zunächst erfolgte die Erhöhung der Leitfähigkeit bei einer Spannung von -100 mV. Wird die cis-Seite der Membran, die das gelöste Rubescensporin enthält, mit rubescensporinfreier Elektrolytlösung bei 0 mV

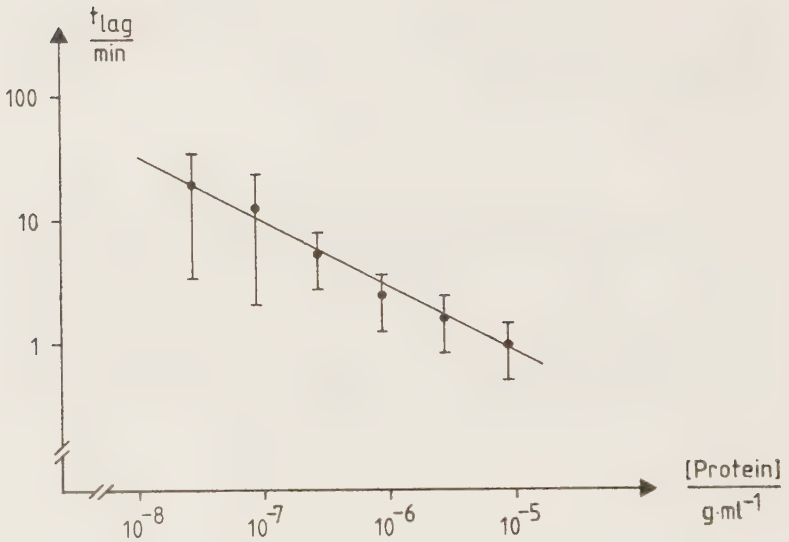


Abb. 3.42: Die Verzögerungszeit t_{lag} in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration auf der cis-Seite der Membran bei einer konstanten Membranspannung von -100 mV. Gewählt wurde eine doppeltlogarithmische Darstellung. Die Verzögerungszeit nimmt mit der eingesetzten Proteinkonzentration ab. Die Regressionsgerade hat eine Steigung von -0.55.

Elektrolytlösung: 1 M NaCl; 10 mM Hepes, pH 7.0

Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPS; Cholesterol (7:2:1)

Membranspannung: -100 mV

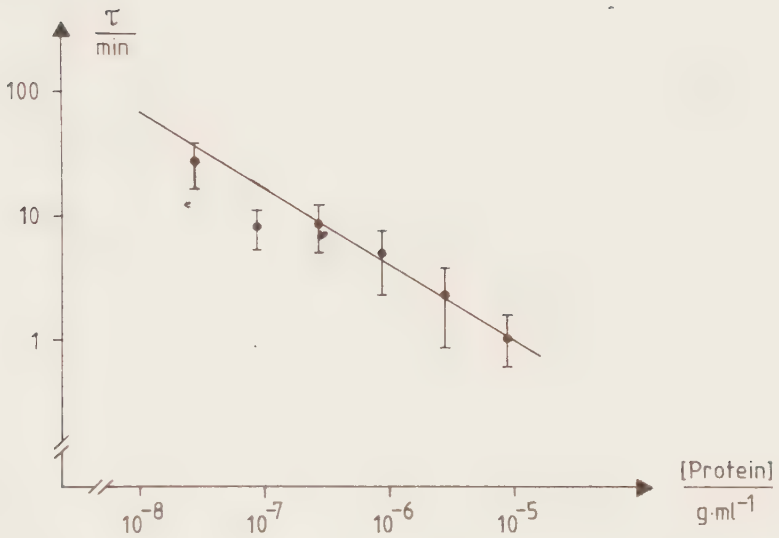


Abb. 3.43: Die Zeitkonstante τ des exponentiellen Stromzuwachses von rubescensporindotierten Lipidmembranen in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration auf der cis-Seite der Membran bei pH 7.0. τ nimmt mit steigender Proteinkonzentration ab. Die konstante Membranspannung betrug -100 mV. Die Steigung der Anpassungsgeraden hat einen Wert von -0.6. Experimentelle Bedingungen s. Abb. 3.42.

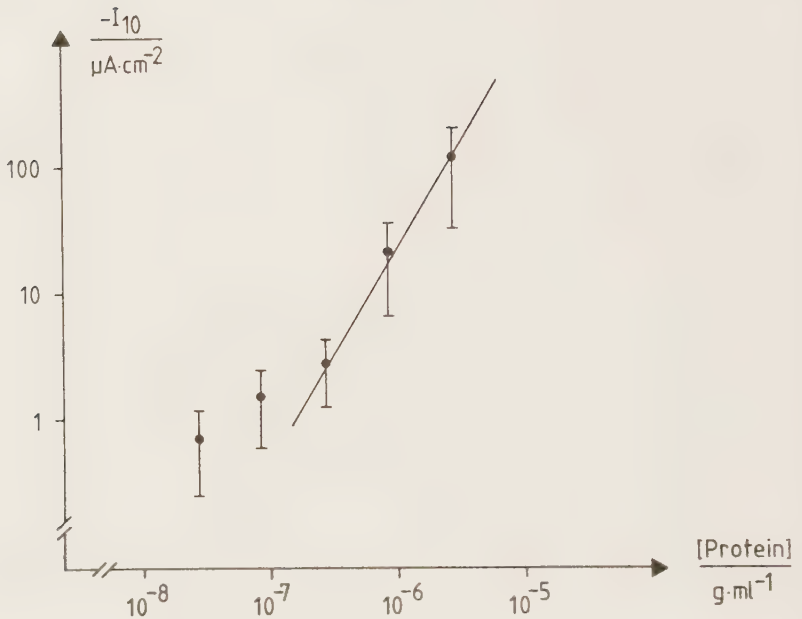


Abb. 3.44: Der jeweils 10 min nach Beginn der Leitfähigkeitszunahme erreichte Membranstromwert I_{10} bei unterschiedlichen Rubescensporinkonzentrationen auf der cis-Seite der Membran und bei einer konstanten Membranspannung von -100 mV. Die Kurve flacht bei niedrigen Proteinkonzentrationen ($<10^{-7}$ g/ml) ab. Die Datenpunkte im Konzentrationsbereich von 0.3-3.0 $\mu\text{g/ml}$ wurden durch eine Gerade angepaßt. Diese hat eine Steigung von 1.8. In diesem Bereich wächst I_{10} somit nahezu quadratisch mit der eingesetzten Proteinkonzentration an.

Experimentelle Bedingungen s. Abb. 3.42.

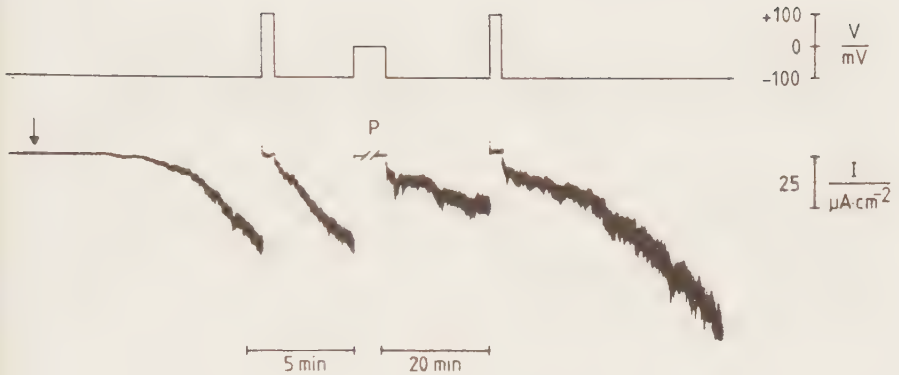


Abb. 3.45: Beispiel eines Perfusionsexperiments an einer rubescensporin-dotierten Membran. Die untere Stromspur beginnt mit dem Membranstrom durch den noch undotierten Lipidbilayer und der Zugabe von Rubescensporin (Pfeil). Nach Zunahme der Leitfähigkeit erfolgt ein Spannungssprung zu +100 mV, der Membranstrom wird nahezu vollständig reduziert. Nach dem Wiederanstieg bei -100 mV erfolgt die Perfusion auf der cis-Seite (P) bei 0 mV. Nach einer zweiten Inaktivierung (+100 mV) wächst der Membranstrom trotz rubescensporinfreier Elektrolytlösung über den unmittelbar vor der Perfusion erreichten Wert hinaus an, wenn auch mit einer geringeren Zuwachsgeschwindigkeit als vor der Perfusion.

Nach der Perfusion wurde ein langsamerer Zeitvorschub gewählt.

Experimentelle Bedingungen:

Elektrolytlösung: 1 M NaCl; 10 mM Hepes, pH 7.2

Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPS; Cholesterol (7:2:1)

Proteinkonzentration: 0.86 μg/ml (cis, vor der Perfusion)

perfundiert, so kommt es nach dem Zurückschalten auf -100 mV erneut zu einem (verlangsamten) Wiederanstieg der Membranleitfähigkeit. Dieser kann nach dem Austauschen der Elektrolytlösung nur die Reaktivierung der bereits vor der Perfusion in der Membran vorhandenen Kanalstrukturen repräsentieren.

Zu einem weiteren Anwachsen des Membranstroms kommt es auch, wenn die Membranleitfähigkeit der perfundierten Membran zwischenzeitlich durch eine hohe positive Membranspannung inaktiviert wurde. Bemerkenswert ist hierbei, daß der Membranstrom trotz der Entfernung des freien Rubescensporins aus der Wasserphase und der zwischenzeitlichen spannungsinduzierten Inaktivierung bei dem Wiederanstieg keinen zeitlich konstanten Endwert erreicht, sondern sogar über das vor der Perfusion erreichte Niveau hinauswächst. Im Gegensatz dazu kann eine phalloporinhaltige Membran bei der Recovery maximal nur die vor der Perfusion erreichte Membranleitfähigkeit wiedererlangen (Kap. 3.1.3.3). Dieser Endwert ist zudem zeitlich konstant.

3.2.2 Die Einzelkanalstruktur des Rubescensporins

Beim Phalloporin läßt sich die Erhöhung der Membranleitfähigkeit auf diskrete Stromfluktuationen einzelner Kanäle mit einem definierten Leitwert zurückführen. Solche Elementarereignisse lassen sich auch in rubescensporindotierten Membranen beobachten, wenn kleine Proteinmengen eingesetzt werden. Die Abb. 3.46 zeigt das typische Fluktuationsbild eines einzelnen Rubescensporinkanals in einer Lipidmembran. Wie beim Phalloporin tritt die Kanalaktivität in Bursts auf, die durch Phasen (Interbursts) getrennt sind, in denen die Kanalaktivität ruht. Die mittleren Lebensdauern der Burst- und der Interburstphasen liegen im Sekundenbereich.

Im Unterschied zum Phalloporin kann der Rubescensporinkanal jedoch innerhalb eines solchen Bursts neben einem geschlossenen Zustand (0) mindestens drei leitende Zustände, bezeichnet mit 1, 2 und 3 annehmen, die sich durch ihre unterschiedlichen Leitwerte auszeichnen.

Diese drei Zustände werden jeweils in strenger Sequenz angenommen. Ihre Leitwerte in 1 M NaCl bei pH 7.0 betragen 100 pS, 180 pS und 690 pS. Die Differenzen aufeinanderfolgender Leitwertstufen sind somit nicht gleich, sondern können beträchtlich variieren.

Bereits der kleinste leitende Zustand des Rubescensporins (1) besitzt einen größeren Leitwert als der Phalloporinkanal unter gleichen Versuchsbedingun-

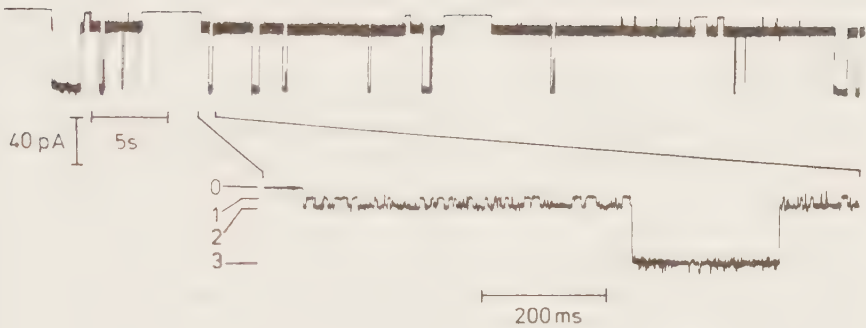


Abb. 3.46: Einzelkanalfluktuationen des Rubescensporins bei einer Membranspannung von -80 mV. Bei niedrigen Proteinkonzentrationen läßt sich das Schaltverhalten einzelner Rubescensporinkanäle in Lipidmembranen beobachten. Öffnungsereignisse werden als Stromablenkungen nach unten registriert. Wie beim Phalloporinkanal (vergl. Abb. 1.8a) tritt die Aktivität von Rubescensporinkanälen in Bursts auf. Die untere Stromspur zeigt den Beginn des dritten Bursts bei einer gedehnten Zeitskala. Neben einem nichtleitenden Zustand (0) kann der Kanal innerhalb eines solchen Bursts mindestens 3 verschiedene Leitwertstufen annehmen (Niveaus 1, 2 und 3), die sich in ihren Leitwerten unterscheiden. Die jeweiligen Leitwerte in Bezug auf das 0-Niveau sind 100 pS, 180 pS und 690 pS. Zu beachten ist das erhöhte Stromrauschen des 3. Niveaus.

Elektrolytlösung: 1 M NaCl; 10 mM Hepes, pH 7.0

Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPS; Ei-PE; Cholesterol (6:2:1:1)

Proteinkonzentration: 80 ng/ml

gen (62 pS). Die mittleren Lebensdauern der ersten beiden Stufen 1 und 2 betragen einige zehn Millisekunden, während die mittlere Lebensdauer der großen 3. Stufe einige hundert Millisekunden beträgt.

Es zeigt sich, daß die Leitwerte dieser Stufen nicht streng konstant sind, sondern selbst während eines Experiments von Burst zu Burst verschieden ausfallen können. So läßt sich die Leitwertabweichung etwa der 2. Stufe bei den in Abb. 3.46 aufgeführten Versuchsbedingungen mit 200 ± 30 pS angeben. Die 3. Stufe zeigt im Vergleich mit der Nulllinie ein deutlich breiteres Stromrauschen.

Dieses Fluktuationsschema von Rubescensporineinzelkanälen ist qualitativ und quantitativ unabhängig, soweit untersucht, von der Lipidzusammensetzung des Bilayers. Das Einzelkanalverhalten ist identisch sowohl in Lipidmembranen mit unterschiedlich starken negativen Überschußoberflächenladungen (z.B. 1,2-POPC; 1,2-POPG in den molaren Verhältnissen 8:2 und 9:1) als auch in Lipidmembranen ohne Überschußoberflächenladungen (z.B. 1,2-POPC; Ei-PE; Cholesterol im Verhältnis 8:1:1). Auch das Ersetzen des negativ geladenen 1,2-DOPS durch das ebenfalls negativ geladene 1,2-POPG (z.B. 1,2-POPC; 1,2-DOPS; Cholesterol bzw. 1,2-POPC; 1,2-POPG; Cholesterol im jeweiligen Verhältnis 7:2:1) und die Beimischung von Kephalinen (z.B. 1,2-POPC; 1,2-POPG; Ei-PE; Cholesterol im Verhältnis 6:2:1:1) ändern das Einzelkanalverhalten nicht.

3.2.2.1 Die Einzelkanalstruktur des Rubescensporins bei Variation des pH-Wertes

Die im vorhergehenden Kapitel beschriebene Einzelkanalstruktur von Rubescensporin ist typisch für neutrale und leicht basische pH-Werte (pH 7.0-8.5). Die Änderung des Einzelkanalverhaltens innerhalb eines breiteren pH-Bereichs verdeutlicht die Abb. 3.47: Gezeigt sind Fluktuationen einzelner Rubescensporinkanäle bei den drei pH-Werten 8.00, 5.75 und 4.75. Die Einzelkanalspur bei pH 8.00 zeigt das in Kap. 3.2.2 dargestellte Verhalten mit dem Fluktuieren des Kanals zwischen drei verschiedenen Leitwertstufen. Ein ähnliches Fluktuationsschema zeigt sich bei pH 4.75; hier kann der Einzelkanal innerhalb eines Bursts ebenfalls drei verschiedene leitende Zustände annehmen, die große 3. Stufe tritt jedoch sehr viel seltener auf als beim basischen pH-Wert. Typisch für sehr niedrige pH-Werte ist vielmehr der Aufenthalt in der 2. Leitwertstufe, die deutlich bevorzugt gegenüber

den anderen angenommen wird.

Das Verhalten des Rubescensporinkanals bei pH 5.75 unterscheidet sich jedoch deutlich von dem bei sehr sauren und basischen pH-Werten. Auffällig ist, daß der Rubescensporinkanal innerhalb eines Bursts praktisch nur noch die 2. Leitwertstufe annimmt. Die 1. Stufe wird nur sehr selten, die große 3. Stufe überhaupt nicht angenommen. Dieses nun sehr homogen erscheinende Fluktuationsschema zeigt der Rubescensporinkanal typischerweise im pH-Bereich von 5-6 und ist dann dem Einzelkanalverhalten des Phalloporins sehr ähnlich (s. z.B. Abb. 1.8a). Bemerkenswert hierbei ist, daß dieses einheitliche Fluktuationsbild in dem pH-Bereich auftritt, in dem die makroskopische Membranleitfähigkeit in Gegenwart von Rubescensporin einen echten Endwert annimmt und nicht exponentiell mit der Zeit anwächst (Abb. 3.41, pH 5.50).

Ein zweites hervorstechendes Merkmal ist, daß die Leitwerte der einzelnen Stufen in dem untersuchten pH-Bereich sehr stark variieren (s. zum Vergleich die Leitwerteichbalken in Abb. 3.47). Während die einzelnen Leitwertstufen bei basischen pH-Werten große Werte erreichen, nehmen sie mit sinkendem pH-Wert deutlich ab. So beträgt der Leitwert der 2. Stufe 260 pS bei pH 8.50, 155 pS bei pH 5.75 und bei pH 4.75 nur noch 23 pS. Die Leitwerte der einzelnen Niveaus des Rubescensporinkanals sind somit stark pH-abhängig.

Die Abb. 3.48 zeigt die Variation der drei Leitwertstufen im pH-Bereich von 4-9. Die Leitwerte sämtlicher Stufen nehmen mit dem pH-Wert S-förmig zu und erreichen bei basischen pH-Werten Maximalwerte. Die 1. Stufe erreicht diesen Maximalwert bereits bei etwa pH 7.0 (140 pS), die 2. Stufe bei etwa pH 9.0 (380 pS). Der entsprechende Bereich der 3. Stufe (1100-1200 pS) liegt bei pH-Werten >9.

Bei niedrigen pH-Werten ($\text{pH} < 5$) erreichen die Leitwertstufen nur noch sehr kleine Werte. So ist der Leitwert der 2. Stufe bei pH 4.0 (6,4 pS) um einen Faktor von ca. 60 gegenüber dem Maximalwert reduziert!

Die 3. Stufe wird im pH-Bereich von 5.0-6.5 nicht beobachtet (s.o.).

Die pH-Abhängigkeit der einzelnen Leitwertstufen wurde in einer Serie von unabhängigen Experimenten bestimmt. Daß dieses Phänomen - die Variation der Leitwerte um einen Faktor 30-60 im pH-Bereich von 4-9 - jedoch kein meßmethodisch bedingtes Artefakt ist, zeigt die Abb. 3.49. Hier wurde der pH-Wert während eines Experiments und innerhalb eines Bursts eines einzelnen aktiven Rubescensporinkanals von pH 7.0 auf pH 3.9 abgesenkt. Man erkennt

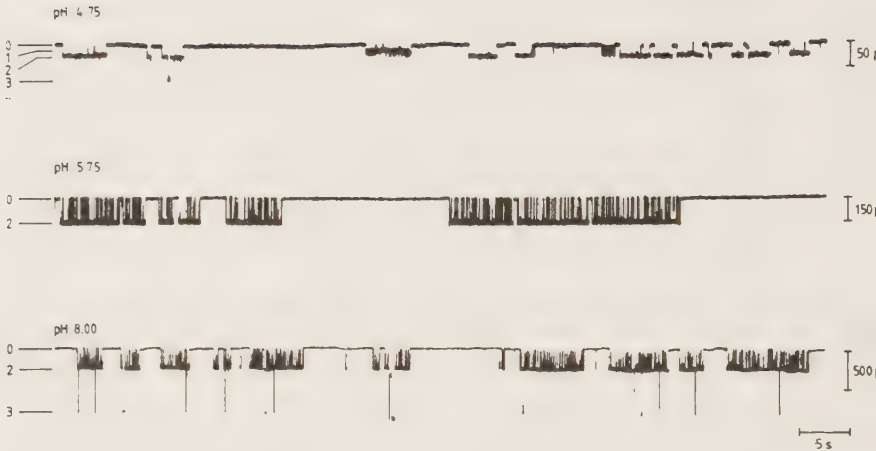


Abb. 3.47: Einzelkanalfluktuationen des Rubescensporins bei 3 verschiedenen pH-Werten. Bei sehr sauren (pH 4.75) und bei neutralen bis basischen pH-Werten (pH 8.50) kann der Rubescensporinkanal innerhalb eines Bursts zwischen den 3 Leitwertstufen 1, 2 und 3 fluktuieren (vergl. Abb. 3.46). Im pH-Bereich 5-6 (mittlere Stromspur) nimmt der Kanal dagegen bevorzugt die 2. Stufe an. Die kleinere 1. Stufe tritt selten auf. Die große 3. Stufe wird überhaupt nicht angenommen. Zu beachten ist ferner die starke Variation der Leitwerte Λ der einzelnen Stufen in diesem pH-Bereich:

pH 4.75: 2. Stufe = 23 pS

pH 5.75: 2. Stufe = 155 pS

pH 8.50: 2. Stufe = 280 pS

Experimentelle Bedingungen:

Elektrolytlösung: 1 M NaCl; 10 mM Puffer

verwendete Puffer: Tris-acetat bei pH 4.75 und pH 8.50

Mes bei pH 5.75

Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPS; Cholesterol (7:2:1)

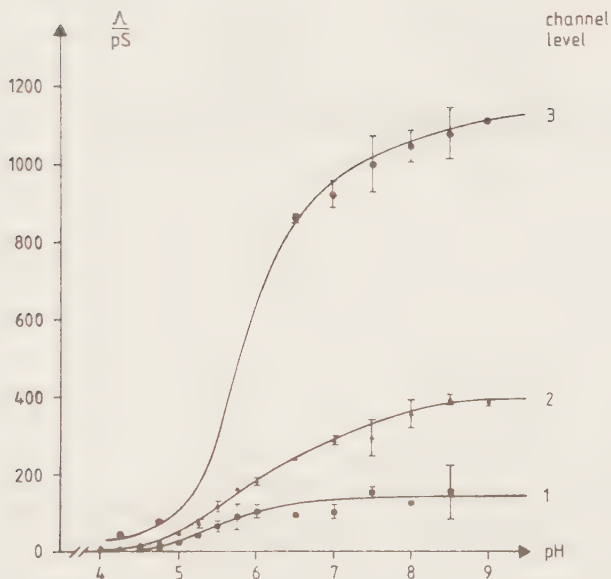


Abb. 3.48: Die Leitwerte Λ der ersten 3 Leitwertstufen des Rubescensporins im pH-Bereich von 4-9.

■ = Stufe 1; ▲ = Stufe 2; ● = Stufe 3

Die Leitwerte nehmen S-förmig mit dem pH-Wert zu. Die 1. Stufe erreicht ihren Maximalwert (140 pS) bei pH 7, die 2. Stufe (380 pS) bei pH 9. Der Maximalwert der 3. Stufe (1100-1200 pS) wird bei pH >9 erreicht. Die 3. Stufe wird im pH-Bereich von 5.0-6.5 nicht beobachtet.

Der Leitwert der 3. Stufe bei pH 4.25 wurde bei einer Membranspannung von -150 mV bestimmt, alle anderen Leitwerte bei -100 mV.

Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPS; Cholesterol (7:2:1)

Elektrolytlösungen: 1 M NaCl; 10 mM Puffer

verwendete Puffer: Tris-acetat bei pH 4.00-5.25 und pH 7.00-9.00

Mes bei pH 5.50-6.50

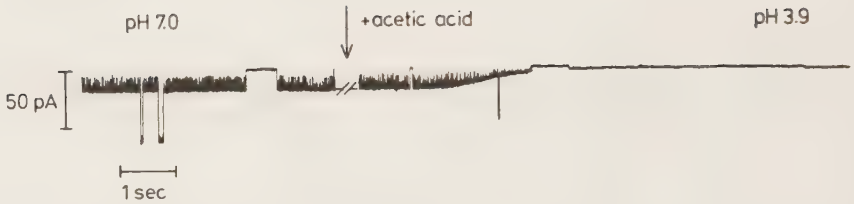


Abb. 3.49: Direkte Demonstration der pH-Abhängigkeit der Leitwertstufen an einem individuellen fluktuierenden *Rubescensporin*kanal. Gezeigt sind Einzelkanalfluktuationen, bei denen die 2. Leitwertstufe am häufigsten angenommen wird. Einzelne Übergänge in die 1. Stufe sind wegen der geringen Zeitauflösung in dieser Darstellung nicht zu erkennen und bewirken ein verbreitertes Stromband der 2. Stufe. Die 3. Stufe wird im ersten Burst zweimal angenommen. Der pH-Wert, der anfänglich 7.0 beträgt, wurde durch Zugabe von 60 μ l einer 1-M-Essigsäure-Lösung zum cis-Kompartiment auf 3.9 abgesenkt (Pfeil, Spurunterbrechung für 10 s). Einige Sekunden nach dieser Erhöhung der H^+ -Ionenaktivität (kein Rühren im cis-Kompartiment) kommt es zu einer kontinuierlichen Verminderung der 2. Leitwertstufe von 230 pS auf ca. 10 pS. Auch die 3. Stufe nimmt während der Abnahme (ein kurzes Öffnungsereignis) einen niedrigeren Wert als bei pH 7.0 an.

Elektrolytlösung: 1 M NaCl; 10 mM Tris-acetat

Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPS; Cholesterol (7:2:1)

Membranspannung: -80 mV

deutlich, daß das Stromniveau der am häufigsten angenommenen 2. Stufe daraufhin innerhalb weniger Sekunden kleiner wird. Der erreichte Endwert ist um mehr als eine Größenordnung kleiner als der anfängliche Wert.

Diese direkte Demonstration der pH-Abhängigkeit der Leitwerte zeigt, daß es sich tatsächlich um eine Eigenschaft des individuellen untersuchten Rubescensporinkanals handelt.

Eine einseitige Variation des pH-Wertes (hier: cis-Seite) genügt dabei, um die Leitwerte des Rubescensporinkanals zu verändern. Derselbe Effekt tritt auf, wenn man den pH-Wert nur auf der trans-Seite absenkt. Der Vorgang ist außerdem voll reversibel; hebt man den pH-Wert nach einer solchen Absenkung durch Zugabe einer entsprechenden Menge einer basischen Tris-Lösung wieder an, so erlangen die Leitwertstufen ihre ursprüngliche Größe wieder (nicht gezeigt).

3.2.2.2 Die Spannungs- und pH-Abhängigkeit des Rubescensporineinzelkanals (qualitativ)

In Kap. 3.2.1.1 und 3.2.1.2 wurde die Spannungsabhängigkeit des Rubescensporins im Vielkanalexperiment dargestellt. Hohe negative Membranspannungen fördern die Leitfähigkeitserhöhung von Lipidmembranen in Gegenwart des Kanalbildners, während positive Membranspannungen ihr entgegenwirken.

Positive Membranspannungen zerstören außerdem eine bei negativen Spannungen aufgebaute Membranleitfähigkeit. Die Abb. 3.50 zeigt das Verhalten eines einzelnen Rubescensporinkanals bei einem Spannungssprungexperiment. Bei -100 mV zeigt der Kanal das dargestellte Fluktuationsverhalten mit der Unterscheidung in eine 1., 2. und 3. Leitwertstufe. Wenige hundert Millisekunden nach einem Spannungssprung zu +100 mV schließt der Kanal auf Dauer (Inaktivierung).

Den Abbau der Vielkanalleitfähigkeit einer rubescensporindotierten Membran durch positive Membranspannungen kann man somit gut mit einer Inaktivierung des Einzelkanals erklären.

Die Kinetik des Rubescensporineinzelkanals in Abhängigkeit von der Membranspannung wurde im einzelnen nicht näher untersucht. Erschwerend ist bei derartigen Messungen, daß der Einbau einzelner Rubescensporinkanäle sehr viel schwieriger zu kontrollieren ist als beim Phalloporin. Der Grund ist, daß der Einbauprozess selbst spannungsabhängig ist und sich die Anzahl der

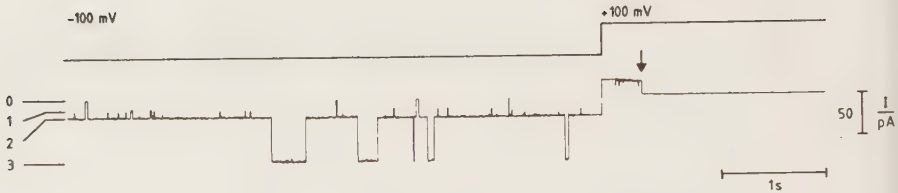


Abb. 3.50: Inaktivierung eines individuellen Rubescensporinkanals bei positiven Membranspannungen. Gezeigt sind die Fluktuationen eines Rubescensporineinzelkanals zwischen den Leitwertstufen 1, 2 und 3 bei -100 mV. Offenereignisse sind als Stromabweichungen nach unten registriert. Nach einem Spannungssprung zu +100 mV schließt der Kanal auf Dauer (Pfeil), es verbleibt die reine Membranleitfähigkeit. Die Leitwerte der Stufen vor dem Sprung betragen: (1) = 122 pS; (2) = 214 pS; (3) = 775 pS.

Die Leitwerte der Stufen 1 und 2, die nach dem Polaritätswechsel angenommen werden (70 bzw. 163 pS), sind kleiner als die ursprünglichen.

Elektrolytlösung: 1 M NaCl; 10 mM Hepes, pH 7.2

Membranzusammensetzung: 1,2-POPC; 1,2-DOPS; Cholesterol (7:2:1)

Kanäle bei einer Variation der Spannung schnell ändert. Die Messung der Schaltkinetik einzelner Rubescensporinkanäle in Abhängigkeit von der Membranspannung gestaltet sich daher sehr schwierig. Eine qualitative Beobachtung zeigt jedoch, daß die mittleren Lebensdauern der einzelnen Leitwertstufen des Rubescensporins in Spannungsbereichen, in denen man eine burstartige Aktivität beobachten kann ($V \leq -50$ mV), keine sehr starke Spannungsabhängigkeit zeigen. Man kann außerdem feststellen, daß die Aufenthaltswahrscheinlichkeit in den höheren Leitwertstufen bei höher negativen Membranspannungen größer wird.

Die Abb. 3.47 stellt das Einzelkanalverhalten des Rubescensporinkanals bei konstanter Membranspannung, aber verschiedenen pH-Werten dar. Ein grober Vergleich ergibt, daß sich die mittleren Lebensdauern der Bursts bei den verschiedenen pH-Werten nicht sehr stark voneinander unterscheiden, die Mittelwerte liegen im Sekundenbereich. Es wird beobachtet, daß die Aufenthaltswahrscheinlichkeit in den höheren Leitwertstufen bei pH-Werten >7 mit Zunahme des pH-Wertes größer wird. Eine Alkalisierung des Mediums hat also auf die Einzelkanalkinetik den äquivalenten Effekt wie eine Verschiebung der Membranspannung zu höher negativen Werten.

Bei niedrigen pH-Werten (pH 4.75, Abb. 3.47) wird im Vergleich zu basischen pH-Werten bevorzugt die 2. Leitwertstufe angenommen. Es entfällt der schnelle, sprunghafte Wechsel zu der kleineren 1. Stufe und dem geschlossenen Zustand (0). Die mittleren Lebensdauern des 2. Zustandes sind im Vergleich zu den Lebensdauern der 1. Stufe (oft nur als kurze Spikes zu erkennen) oder des geschlossenen Zustandes (0) innerhalb eines Bursts lang.

4. Diskussion

4.1 Untersuchung der kanalbildenden Proteine Phalloporin und Rubescensporin in planaren künstlichen Lipidmembranen

Die in der Literatur beschriebenen Untersuchungen der cytolytischen Aktivitäten von Phallolysin und Rubescenslysin in den früheren Jahren zeigten, daß der Angriffspunkt beider Toxine die Zellmembranen sind und die hämolytischen Effekte auf einer Erhöhung der Ionenpermeabilität beruhen (Seeger und Wachter, 1982; Seitz et al., 1981). Es handelt sich in beiden Fällen um wasserlösliche Proteine aus Pilzen der Gattung *Amanita*. Trotz ihrer ähnlichen biologischen Herkunft und ihrer nahezu identischen molekularen Masse (34000-35000 D) unterscheiden sich die beiden Toxine in ihren cytolytischen Wirkungsweisen auf Zellen.

Durch biochemische Methoden allein läßt sich jedoch der Mechanismus solcher leitfähigkeitserhöhenden Strukturen, etwa eine Kanalbildung im Lipidbilayer der Zellmembran, nur unzureichend charakterisieren. Weiter führen hier die elektrochemischen Meßmethoden, die im Rahmen dieser Arbeit angewendet wurden. Mit ihnen lassen sich kanalbildende Eigenschaften von Substanzen aus beiden Pilzarten durch die Erhöhung der elektrischen Leitfähigkeit vorgeformter, künstlicher Lipidbilayer mit einer sehr hohen Empfindlichkeit nachweisen.

Neuere Untersuchungen zeigten, daß das hämolytisch wirksame Protein Phallolysin und das kanalbildende Protein Phalloporin entgegen früheren Annahmen nicht identisch sind; im Eluat einer S300-Sephacryl-Säule beobachtet man eine ungleiche Verteilung der kanalbildenden und der cytolytischen Aktivität (Kap. 1.3.3.3). Aus diesem Grunde müssen beide Substanzen getrennt voneinander betrachtet werden.

Analoge Untersuchungen zur Identität des cytolytischen Proteins aus *Amanita rubescens* und des entsprechenden Kanalbildners stehen noch aus. Im folgenden wird - analog zum Phalloporin - der Kanalbildner Rubescensporin getrennt von der hämolytisch wirksamen Substanz Rubescenslysin diskutiert.

4.2 Einbau von Phalloporin und Rubescensporin in künstliche planare Lipidbilayer

Sowohl *Amanita phalloides* als auch *Amanita rubescens* zeichnen sich durch den Besitz wasserlöslicher Proteine aus, die sich in künstliche Lipidmembranen einbauen und durch eine kanalbildende Wirkung die Membranleitfähigkeit erhöhen können. Beide Kanalbildner zeigen dabei markante Unterschiede in der Steuerung des Einbaus durch äußere Faktoren wie pH-Wert und Membranspannung.

4.2.1 Phalloporin

Die kanalbildende Wirkung von Phalloporin erweist sich bei neutralen und basischen pH-Werten zunächst als sehr gering. Die Aktivierung einzelner Kanäle gelingt dann nur, wenn an der Lipidmembran eine negative Spannung anliegt und repetitive Spannungssprünge erfolgen. Offensichtlich besitzt das gelöste Phalloporinmolekül in diesem pH-Bereich eine Konformation, mit der eine spontane Einlagerung von der Wasserphase in den Lipidbilayer energetisch sehr ungünstig ist. Ein elektrisches Feld der entsprechenden Polarität kann aber zunächst an die Membran adsorbierte Phalloporinmoleküle in eine für die Einlagerung günstige Ausrichtung zur Membran bringen. Die abrupten Änderungen des elektrischen Feldes bei Spannungssprüngen katalysieren dann in einem weiteren Schritt die endgültige Inkorporation und die Aktivierung zum fluktuierenden Kanal. Es ist denkbar, daß dabei elektrisch geladene Molekülteile über die Membran transferiert werden, die den spannungsfreien, spontanen Einbau wegen der hohen zu überwindenden energetischen Barriere behindern.

Eine notwendige Vororientierung adsorbierter Moleküle ist durchaus plausibel, da mehr als 98 Prozent aller auf diese Weise eingebauten Phalloporinkanäle eine Spannungsabhängigkeit mit der in Abb. 1.8b dargestellten Polarität, d.h. eine Aktivitätserhöhung durch positive Spannungen, zeigen. Dieses spannungsabhängige Verhalten beschreibt man formal durch die Zuordnung einer negativen Schaltladung (gating charge), die bei der Kanalöffnung von der trans- zur cis-Seite verschoben wird.

Ein einmal aktivierter Phalloporinkanal ist fest in der Membran verankert und unterliegt im Spannungsbereich von ± 100 mV keiner irreversiblen Inaktivierung. Stromfluktuationen einzelner Phalloporinkanäle lassen sich so für

die Dauer des Experiments über Stunden aufrecht erhalten, ohne daß sie eine Änderung ihres Schaltverhaltens zeigen.

Bei pH-Werten, die unterhalb von pH 6.5 liegen, ändert sich das Einbauverhalten des Phalloporins allerdings drastisch. Anders als in alkalischen und neutralen Elektrolytlösungen ist es nun in der Lage, sich spontan, ohne negative Membranspannungen und Spannungssprünge, in Lipidmembranen einzubauen. Unter diesen Bedingungen kommt es nach der Applikation des Proteins und einer Verzögerungszeit zu einer Erhöhung des Membranstroms, der zunächst steil zunimmt und sich nach Durchlaufen eines Punktes maximaler Steigung $(\Delta I/\Delta t)_{\max}$ verlangsamt. Ein echter Endwert wird jedoch im Verlaufe von mehreren Stunden nicht erreicht.

Einen ähnlichen zeitlichen Verlauf der Kanalinkorporation zeigen die Porine (Benz et al., 1978) sowie die kanalbildenden Colicine (Davidson et al., 1984 a). Beim α -Toxin aus *Staphylococcus aureus* wird dagegen ein stabiler Endwert erreicht (Belmonte et al., 1986), ebenso beim Rubescensporin im pH-Bereich von 5.0–6.5 (Abb. 3.41).

Mehrere Einbauparameter quantifizieren die Einbaukinetik des Phalloporins. Die maximalen Einbauraten $(\Delta N/\Delta t)_{\max}$ und die Anzahl N_{45} der nach 45 min eingebauten Kanäle erreichen im pH-Bereich von 4.0–4.5 konstante maximale Werte. Ein Vergleich der Daten zeigt, daß der spontane Einbau bei pH 4.0 um mehrere Größenordnungen effektiver ist, als der mit der Spannungsaktivierungsmethode erzielte bei neutralem und basischem pH. Lassen sich mit der letzteren Methode im Laufe eines Experiments kaum mehr als zehn einzelne Phalloporinkanäle ausbilden (10^3 bis 10^4 Kanäle pro cm^2 Membranfläche), so können bei pH 4.0 Kanaldichten von mehr als 10^7 Kanälen pro cm^2 erreicht werden (≈ 1 Kanal pro $10 \mu\text{m}^2$). Das bedeutet in 1-M-Salzlösungen eine Erhöhung der Membranleitfähigkeit um 4 bis 5 Größenordnungen. Ein weiterer Unterschied zu der Spannungsaktivierungsmethode ist, daß der spontane Einbau nicht von der Polarität der Spannung abhängt. Er erfolgt bei niedrigen pH-Werten sowohl bei negativen als auch positiven Membranspannungen.

Daß ein pH-abhängiger Membraneffekt das Einbauverhalten des Phalloporins steuert, erscheint ausgeschlossen. Zwar besitzt das in diesen Versuchen verwendete, bei neutralem pH negativ geladene Phosphatidylserin einen pK-Wert (≈ 4.4 ; Van Dijk et al., 1978), der in dem in Frage kommenden pH-Bereich liegt, doch läßt sich der pH-induzierte Einbau von Phalloporin auch erzielen, wenn man das Phosphatidylserin in den Membranen vollständig durch das zwitterionische Phosphatidyläthanolamin ersetzt.

Diese Befunde deuten darauf hin, daß die pH-Abhängigkeit des Phalloporin-einbaus vielmehr auf einer pH-induzierten Veränderung des Kanal moleküls selbst beruht. Diese Veränderung könnte darin bestehen, daß das Molekül durch die Protonierung eines oder mehrerer Aminosäurereste eine andere Konformation annimmt, mit der die Aktivierungsenergie für die Einlagerung in die hydrophobe Bilayermatrix stark herabgesetzt und die spontane Kanalbildung energetisch begünstigt wird. Man erwartet einen solchen Effekt vor allem dann, wenn das wasserlösliche Proteinmolekül in seiner protonierten Konformation stärker hydrophob ist als in seiner unprotonierten und dadurch einen mehr amphipathischen Charakter erhält. Dies erklärt, warum dann keine katalysierenden Bedingungen wie ein elektrisches Feld und Spannungssprünge notwendig sind.

In der Literatur wurden in den letzten Jahren für mehrere wasserlösliche cytolytisch wirksame Substanzen ähnliche, durch äußere Faktoren induzierte Übergänge von einem hydrophilen in einen amphipathischen Zustand beschrieben. Ähnlich wie das Phalloporin verhalten sich die Colicine A und E1. Ihre Affinität zu Lipidgrenzflächen erhöht sich ebenfalls drastisch, wenn man den pH-Wert erniedrigt (Pattus et al., 1983 b; Davidson et al., 1984 b, 1985). Am besten untersucht ist die pH-Abhängigkeit des Colicins E1. Sowohl der pH-abhängige Einbau dieses Kanalbildners als auch die ionenleitende Aktivität ist wie beim Phalloporin maximal bei niedrigen pH-Werten, mit einem effektiven pK-Wert von 4.6 (Davidson et al., 1985) bzw. 3.8-4.0 für das durch Molekülspaltung erhaltene C-terminale Fragment (Davidson und Cramer, 1984; Davidson et al., 1984 b). Wie beim Phalloporin hängt die pH-abhängige Inkorporation nicht von der Polarität der Membranspannung ab (Davidson et al., 1985). Gleichzeitig zeigen Circular dichroismus-Untersuchungen, daß sich der α -helikale Anteil des Colicins E1 bei einer solchen pH-Erniedrigung um 10 Prozent erhöht, wobei der effektive pK-Wert bei 4.0 liegt. Der Schluß liegt deshalb nahe, daß der pH-abhängige Einbau dieses Kanalbildners durch drastische Konformationsänderungen des Moleküls in seinem kanalbildenden Teil gesteuert wird. Man weiß heute, daß die Protonierung und Neutralisierung nur eines Glutamatrestes ausreicht (s.u.), damit sich die für die Einlagerung aufzubringende freie Aktivierungsenthalpie vermindert und das Protein in der unpolaren Bilayerphase eine energetisch günstige Konformation annehmen kann (von Heijne und Blomberg, 1979; Davidson et al., 1984 a).

Als weitere Beispiele solcher pH-abhängigen hydrophil-amphipathischen

Umwandlungen bei cytolytischen, kanalbildenden Toxinen sind das Tetanus-Toxin (Boquet und Duflot, 1982) und das Diphtherie-Toxin zu nennen. Im Falle des kanalbildenden Fragments B des Diphtherie-Toxins kommt es ebenfalls zu einem pH-abhängigen Übergang von einem hydrophilen zu einem amphipathischen Zustand, der mit einer durch niedrigen pH induzierten Porenbildung einhergeht (Donovan et al., 1981; Kagan et al., 1981; Sandvig und Olsnes, 1981; Misler, 1983, 1984; Blewitt et al., 1985). Der effektive pK-Wert dieser pH-gesteuerten Umwandlung beider Toxine liegt typischerweise auch im pH-Bereich von 4-5 (Sandvig und Olsnes, 1981; Boquet und Duflot, 1982). Durch den pH-Wert gesteuerte Funktionen, die auf einer Verstärkung des amphipathischen Charakters beruhen, sind weiterhin kennzeichnend für eine Reihe von viralen Fusionsproteinen (Helenius et al., 1980; White und Helenius, 1980; Skehel et al., 1982). Bei allen diesen Beispielen werden pH-abhängige Konformationsänderungen beobachtet (Sandvig und Olsnes, 1981; Boquet und Duflot, 1982; Skehel et al., 1982), die die funktionellen Eigenschaften dieser Proteine steuern.

Die ähnliche pH-Abhängigkeit des Proteineinbaus von Colicin E1, Tetanus-Toxin, Diphtherie-Toxin und Phalloporin in vitro zeigt, daß die Protonierung von Aminosäuren und die resultierende Konformationsänderung in Gegenwart von Membranlipiden für den Inkorporationsmechanismus aller dieser Proteine relevant ist!

Es soll erwähnt werden, daß bei einer Reihe weiterer cytolytischer und kanalbildender Toxine andere äußere Faktoren als der pH-Wert ähnliche hydrophil-amphipathische Umwandlungen steuern. So ist die Inkorporation in den Lipidbilayer beim Staphylococcus- α -Toxin und beim C5b-C9(m)-Komplementsystem abhängig von einer Molekülaggregation. Im aggregierten Zustand können nämlich beide Proteine vorher im Molekülinneren verborgene, apolare Reste exponieren, so daß der Übertritt in den Lipidbilayer energetisch begünstigt wird (Mayer, 1972; Müller-Eberhard, 1975; Bhakdi und Tranum-Jensen, 1978).

Das Phalloporin steht somit in einer langen Reihe wasserlöslicher cytolytischer Substanzen, deren kanalbildenden Eigenschaften über eine sterische Veränderung des Proteinmoleküls gesteuert werden. Äußere Faktoren wie der pH-Wert oder eine Selbstassoziierung induzieren diese Konformationsänderungen.

Beim Phalloporin lassen sich die Darstellungen der Einbauparameter N_{45} und $(\Delta N/\Delta t)_{\max}$ in Abhängigkeit vom pH-Wert gut als Titrationskurve schwach

saure Gruppen am Kanalkomplex beschreiben. Eine Auftragung nach der Henderson-Hasselbalch-Beziehung ergibt, daß nur ein oder zwei Protonen an dieser Reaktion beteiligt sind.

Über die Art der beteiligten Gruppen kann man zunächst nur spekulieren. Die Henderson-Hasselbalch-Darstellung ergibt einen pK-Wert von 4.8-4.9. Man muß dabei allerdings berücksichtigen, daß die künstlichen Lipidmembranen wegen des Gehaltes an DOPS eine negative Oberflächenladung tragen und deshalb der pH-Wert an der Bilayer-Wasser-Grenzfläche aufgrund des Gouy-Chapman-Effektes niedriger liegt als in der freien Elektrolytlösung. Bei einem molaren Anteil von 20 Prozent DOPS beträgt die pH-Verschiebung unmittelbar an der Grenzfläche maximal 0.7 pH-Einheiten (Wilmsen, 1983), so daß man den ermittelten pK-Wert entsprechend nach unten korrigieren muß. Als wahrscheinlichsten Kandidaten für die titrierbaren Gruppen kann man Glutaminsäurereste in Betracht ziehen, die mit ihrem Seitengruppen-pK-Wert von 4.25 (Lehninger, 1977) gerade in den in Frage kommenden Bereich fallen.

Bemerkenswert ist die Analogie zu dem Colicin E1. Die pH-abhängigen Kanalfunktionen zeigen hier einen effektiven pK-Wert von 4.0, und als beteiligte Aminosäure wird der Glutamatrest 468 ins Auge gefaßt (Davidson et al., 1984 a). Wie effektiv die Protonierung einer einzigen Aminosäure bei einer solchen hydrophil-amphipathischen Umwandlung sein kann, zeigt die Zunahme des α -helikalen Anteils in der Sekundärstruktur des Colicins um rund 10 Prozent, was 19-20 Aminosäuren entspricht (Brunden et al., 1984). Dies wäre gerade ausreichend, um eine zusätzliche membranüberspannende α -Helix zu schaffen, da etwa 20 Aminosäuren benötigt werden, um einen Bilayer in α -helikaler Form zu durchdringen (Engelman und Steitz, 1981; Kyte und Doolittle, 1982).

4.2.2 Rubescensporin

Auch das Rubescensporin vermag nach Zugabe auf einer Membranseite spontan die Leitfähigkeit des Lipidbilayers um mehrere Größenordnungen zu erhöhen. Wie beim Phalloporin kommt es nach einer Verzögerungszeit zu einem Anstieg des Membranstroms. Im Gegensatz zum Phalloporin ist der Einbau des Rubescensporins über den gesamten untersuchten pH-Bereich (4-9) möglich, jedoch in Abhängigkeit von der Membranspannung. Negative anliegende Spannungen begünstigen die Kanalbildung, während positive ihr entgegenwirken. Bei neutralen und basischen pH-Werten erreicht die Zunahme des Membran-

stroms bei einer vorgegebenen hohen negativen Spannung keinen stationären Endwert, sondern verläuft nach einer Anlaufphase exponentiell mit der Zeit. Hierin unterscheidet sich der Einbau des Rubescensporins von dem des Phalloporins. Kann man beim Phalloporin vom Einbau eines stabilen, einheitlich strukturierten Komplexes ausgehen (s.u.), so läßt sich der exponentielle Stromanstieg durch den Einbau von Rubescensporin als ein Assoziierungsprozeß von Proteinmonomeren in der Membran deuten (s. Anhang, Kap. 6.4).

Dieser Aggregationsprozeß muß spannungsabhängig sein. Das wird in Abb. 3.36 deutlich. Spannungssprünge zu +100 mV führen zu einem Abbau einer vorher bei -100 mV aufgebauten Membranleitfähigkeit praktisch auf das Niveau der reinen Lipidmembran. Nach dem Spannungssprung zurück zu -100 mV kommt es erst nach einer kurzen Verzögerungszeit wieder zu einem erneuten exponentiellen Anstieg der Membranleitfähigkeit. Dieses Verhalten legt den Schluß nahe, daß Rubescensporin nur bei negativen Membranspannungen assoziiert und bei positiven Membranspannungen die gebildeten leitfähigen Aggregate wieder zerfallen.

Ein ähnlicher, von der Polarität der Membranspannung abhängiger Einbau wurde für die kanalbildenden Colicine beschrieben (Davidson et al., 1984 a,b), sowie für das Diphtherie-Toxin (Kagan et al., 1985) und das cytolytische Toxin der Seeanemone *Stoichactis helianthus* (Varanda und Finkelstein, 1980).

Wie stark die Kanalbildung durch Rubescensporin von der Membranspannung beeinflusst wird, äußert sich besonders deutlich in der starken Spannungsabhängigkeit der Zeitkonstanten τ des exponentiellen Stromanstiegs (Abb. 3.35a). Hier kommt klar die Begünstigung der Aggregation von Rubescensporin durch hohe negative Spannungen zum Ausdruck: Je höher die negative Spannung ist, desto schneller verläuft die Leitfähigkeitszunahme.

Werden schließlich sehr hohe Membranleitfähigkeiten erreicht ($g > 10^{-4} \text{ S/cm}^2$ in 1 M NaCl), kommt es zur Zerstörung des Lipidbilayers. Die fortlaufende Aggregation von Proteinmonomeren zieht also eine Destabilisierung der Bilayerstruktur nach sich. Im Gegensatz dazu sind phalloporindotierte Bilayer auch bei den höchsten erreichten Membranleitfähigkeiten noch über Stunden stabil. Dies deutet darauf hin, daß Rubescensporin in Lipidbilayern nicht nur die Bildung von Ionenkanälen verursacht, sondern darüber hinaus auch eine detergensartige, Lipidbilayerstrukturen destabilisierende, Wirkung ausübt.

Ein ähnlicher Zusammenhang zwischen einer solchen kooperativen, detergensartigen Wirkung und einer Kanalbildung wurde für eine Reihe anderer wasserlöslicher cytolytischer Proteine vorgeschlagen, so für das Seeanemonen-Toxin aus *Stoichactis helianthus* (Shin et al., 1979), das Antibiotikum Alamethicin (Jung et al., 1981) und das Bienengift Melittin (Hanke et al., 1983).

Die Inkorporation von Rubescensporin ist allgemein nicht abhängig vom pH-Wert der Elektrolytlösung. Ein spontaner Einbau wurde über den gesamten untersuchten Bereich (pH 4-9) gefunden, während das Phalloporin zum spontanen Einbau einen niedrigen pH-Wert (< 6.5) benötigt. Offensichtlich gehört das Rubescensporin somit nicht zu der Klasse der wasserlöslichen cytolytischen Substanzen, bei denen der pH-Wert eine Umwandlung von einem hydrophilen Molekül in einen amphipathischen, kanalbildenden Komplex steuert. Mit seinem Assoziierungsmechanismus steht es eher dem *Staphylococcus*- α -Toxin und dem Komplementsystem C5b-C9(m) nahe, die ihren amphipathischen Charakter erst durch eine Selbstassoziiierung erlangen (Mayer, 1972; Müller-Eberhard, 1975; Bhakdi und Trantum-Jensen, 1978).

4.3 Konzentrationsabhängigkeit

4.3.1 Phalloporin

Der Einbau des Phalloporins bei niedrigen pH-Werten wurde quantitativ mit mehreren definierten Einbauparametern beschrieben.

a.) Die Verzögerungszeit t_{lag} zwischen der Applikation und dem Auftreten des ersten Membrankanals nimmt mit zunehmender Konzentration an Phalloporin ab. Bei einer doppeltlogarithmischen Auftragung ergibt sich ein Exponent von -0.35 . Die Abhängigkeit der Verzögerungszeit von der eingesetzten Proteinkonzentration ist etwas schwächer als bei dem *Staphylococcus*- α -Toxin. Hier wurde ein Exponent von etwa -0.4 gefunden (Belmonte et al., 1986).

Man muß hierbei berücksichtigen, daß innerhalb der Verzögerungszeit mit Sicherheit eine Vielfalt von Prozessen abläuft, so die Diffusion zur und die Anlagerung der Moleküle an die Membran, Orientierungsprozesse, eventuell noch notwendige Konformationsänderungen vor der Inkorporation in den Bilayer usw. Insbesondere beim α -Toxin muß man auch die an der Grenzfläche stattfindenden, zeitabhängigen Aggregationsschritte zu einem kanal-

bildenden Komplex (Pentamer, Hexamer) mit einbeziehen. Die Verzögerungszeit kann deshalb sicher nicht als eine nur von einem Prozeß abhängige Variable angesehen werden. Vielmehr umfaßt sie verschiedenartige, komplexe molekulare Abläufe. Das macht eine umfassende und genaue mathematische Beschreibung der Verzögerungszeit außerordentlich schwierig. Verschiedene Ansätze, die entweder nur durch Diffusion oder Adsorption an die Membran bestimmte Prozesse zugrunde legten, führten bisher zu keinem befriedigenden Ergebnis. Die Verzögerungszeit allein erlaubt also nur in begrenztem Maße Rückschlüsse auf den eigentlichen Kanalbildungsmechanismus. Eine Analyse muß sich hier zunächst auf einen Vergleich mit anderen Kanalbildnern beschränken.

b.) Der Parameter N_{45} gibt die Anzahl an Phalloporinkanälen an, die sich jeweils nach 45 Minuten bei gegebener Membranspannung und pH-Wert in die Membran eingebaut haben. Bei der doppeltlogarithmischen Auftragung gegen die Proteinkonzentration ergibt sich ein Exponent von 0,63.

Für das Staphylococcus- α -Toxin liefert eine entsprechende Auftragung des erreichten stationären Endwertes einen Exponenten von 2,3 (Belmonte et al., 1986). Im Unterschied zum Phalloporin erreicht der Einbau des α -Toxins einen echten Endwert, während die Einbaukurven des Phalloporins in eine langsame, stetige Drift übergehen (Abb. 3.4). Deshalb wurde vereinbarungsgemäß ein Zeitpunkt $t - t_{lag} = 45$ min nach Erstauftreten eines Kanals (Ende der Verzögerungszeit) zur Bestimmung der Kanalanzahl festgelegt. Die Ursache der stetigen Drift kann noch nicht befriedigend erklärt werden.

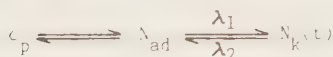
Im Unterschied zu dem Steady-state-Wert des α -Toxins handelt es sich bei dem Parameter N_{45} um keine echte Gleichgewichtsgröße. Ein Exponent <1 legt nahe, daß beim Phalloporin in der Membran keine Assoziation von Monomeren zu einem Kanalkomplex stattfinden muß. Zumindest für stationäre Endwerte erwartet man in diesem Fall Exponenten, die größer als 1 sind.

c.) Der Einbauparameter $(\Delta N/\Delta t)_{max}$ gibt die maximale Einbaurrate eines Einbauprozesses bei gegebener Membranspannung und pH-Wert wieder. Die doppeltlogarithmische Auftragung gegen die Proteinkonzentration liefert einen Exponenten von 0,96. Die maximale Steigung $(\Delta N/\Delta t)_{max}$ ist somit in guter Näherung direkt proportional zur Phalloporinkonzentration. Formal entspricht diese Beziehung einer Reaktion erster Ordnung, bei der der Kanalkomplex von der Wasserphase bzw. aus einem adsorbierten Zustand in die Membran gelangt und dort sofort einen Kanal bildet. Das heißt, daß keine weiteren Aggregationsschritte und keine anderen kooperativen Prozesse mit

anderen Molekülen hinzukommen. Diese Beziehung sagt jedoch nichts Näheres über die eigentliche biochemische Beschaffenheit des Kanals aus, der ja bereits in der Wasserphase aus einem Proteinkomplex mehrerer, fest zusammenhängender Untereinheiten bestehen könnte.

Beim Staphylococcus- α -Toxin ergibt die konzentrationsabhängige Auftragung von $(\Delta N/\Delta t)_{\max}$ dagegen einen Exponenten von 2,0 (Belmonte et al., 1986). Beim kanalbildenden Fragment des Diphtherie-Toxins nimmt die Stromzuwachsrate bei einer gegebenen Spannung ebenfalls mit dem Quadrat der Proteinkonzentration zu (Kagan et al., 1981). Diese im Vergleich zum Phalloporin stärkeren Konzentrationsabhängigkeiten (Reaktionen höherer Ordnung) weisen auf zusätzliche, in der Membran stattfindende Oligomerisationsprozesse bei beiden Toxinen hin.

Um das Einbauverhalten des Phalloporins formal beschreiben zu können, wird in Kap. 6.1 ein einfaches Reaktionsschema vorgeschlagen. Dabei nimmt man an, daß das Phalloporin beim Übergang von der Wasserphase zum fluktuierenden Kanal einen adsorbierten Zwischenzustand an der Membran durchlaufen muß (Gl. 6.1):



c_p ist die Konzentration an freiem Phalloporin in der Wasserphase, N_{ad} die Anzahl der Moleküle im adsorbierten Zustand und $N_k(t)$ die Anzahl der fluktuierenden Kanäle in der Membran. Da ein solcher Einbauprozess sich als Summe zweier Exponentialfunktionen beschreiben läßt (Gl. 6.9), können die Geschwindigkeitskonstanten λ_1 und λ_2 durch eine entsprechende halblogarithmische Auftragung bestimmt werden (Abb. 3.4b). Anhand dieses Reaktionsschemas ist es nun möglich, theoretische Angaben über die Abhängigkeit der Einbauparameter von der Phalloporinkonzentration zu machen. Durch einen Vergleich mit den experimentell ermittelten Daten läßt sich die Gültigkeit des vorgeschlagenen Einbaumodells überprüfen.

Als Folgerung leitet sich aus diesem Schema ab, daß die Größen $(\Delta N/\Delta t)_{\max} = \mu$, N_{45} und λ_2 als Funktionen der Phalloporinkonzentration c_p die Bedingung (Gl. 6.11)

$$N_{45}(c_p) = \frac{\mu(c_p)}{\lambda_2(c_p)}$$

erfüllen müssen. Eine weitere Forderung ist, daß $(\Delta N/\Delta t)_{\max} = \mu$

proportional zu c_p sein muß (Gl. 6.12). Diese Bedingung ist, wie oben bereits gezeigt, mit guter Näherung erfüllt.

Experimentell wurde für die Konzentrationsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten λ_2 ein Exponent von 0.34 ermittelt. Mit Hilfe von Gl. 6.11 kann man nun unmittelbar eine theoretische Konzentrationsabhängigkeit für N_{45} angeben. Da $\mu \sim c_p$ und $\lambda_2 \sim c_p^{0.34}$, erhält man nach Gl. 6.11 für die Konzentrationsabhängigkeit von N_{45} theoretisch den Exponenten $1 - 0.34 = 0.66$. Experimentell wurde für N_{45} ein Exponent von 0.63 bestimmt. Die Tab. 4.1 zeigt eine Gegenüberstellung der experimentell gefundenen und der nach dem vorgeschlagenen dreistufigen Einbauschema theoretisch ermittelten Daten. Ihre Übereinstimmung ist in jedem Fall hinreichend gut und kann als starkes Argument für das vorgeschlagene Einbaumodell geltend gemacht werden.

Ein interessanter Gesichtspunkt für die Diskussion des Phalloporineinbaumechanismus ist die experimentell gefundene Konzentrationsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten λ_2 . Sie besagt nämlich, daß die Rückdiffusion von fluktuierenden Phalloporinkanälen in die Wasserphase von der Konzentration an freiem Phalloporin in der Elektrolytlösung abhängt. Daraus ist zu ersehen, daß Phalloporinkanäle in der Membran mit freiem Phalloporin in der Wasserphase wechselwirken müssen, um wieder ausgebaut zu werden. Die Art dieser Wechselwirkung ist jedoch völlig unklar.

Ein Grenzfall der Konzentrationsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten λ_2 ist, daß die Rückdiffusion von Kanälen aus der Membran verschwindet, wenn freies Phalloporin aus der Wasserphase entfernt wird. Genau das wird in den Perfusionsexperimenten beobachtet. Nach dem Austauschen der phalloporinhaltigen durch phalloporinfreie Elektrolytlösung verbleibt der Membranstrom auf einem konstanten Niveau und sinkt bei Abwesenheit des Kanalbildners in der Wasserphase nicht ab (Abb. 3.13).

	N_{45}	$\mu = \left(\frac{\Delta N}{\Delta t} \right)_{\max}$	λ_2
experimentell und theoretisch		$\sim c_p$	
experimentell	$\sim c_p^{0.63}$		$\sim c_p^{0.34}$
theoretisch	$\sim c_p^{0.66}$		

Tab. 4.1: Vergleich von theoretischen und experimentellen Daten zu den Konzentrationsabhängigkeiten der Größen N_{45} , $\mu = (\Delta N / \Delta t)_{\max}$ und λ_2 . Ein dreistufiges sequentielles Reaktionsschema für den Einbauprozess des Phalloporins sagt für $\mu = (\Delta N / \Delta t)_{\max}$ eine direkte Proportionalität zu c_p voraus (Kap. 6.1; Gl. 6.12). Dies wurde auch experimentell gefunden (Abb. 3.11; Kap. 3.1.1.3.3). Der Exponent der Konzentrationsabhängigkeit von λ_2 wurde experimentell mit 0.34 bestimmt. Damit läßt sich nach Gl. 6.11 der Exponent der Konzentrationsabhängigkeit von N_{∞} bzw. N_{45} theoretisch bestimmen als $1 - 0.34 = 0.66$. Experimentell wurde ein Exponent von 0.63 ermittelt (Abb. 3.10; Kap. 3.1.1.3.2).

4.3.2 Rubescensporin

Entsprechend Abb. 3.33 kommt es nach Applikation von Rubescensporin anders als beim Phalloporin zu einem einfach exponentiellen Anstieg der Membranleitfähigkeit. Daher ist man zu der Wahl anderer Einbauparameter als beim Phalloporin gezwungen, um die Kanalbildung des Rubescensporins quantitativ zu erfassen. Hier bieten sich neben der Verzögerungszeit t_{lag} und dem jeweils $t - t_{lag} = 10$ min nach Beendigung der Verzögerungsphase erreichten Membranstromwert I_{10} die Zeitkonstante τ des exponentiellen Stromverlaufs an.

a.) Die doppeltlogarithmische Auftragung der Verzögerungszeit t_{lag} gegen die Rubescensporinkonzentration liefert einen Exponenten von -0.62 . Oben (Kap. 4.3.1) wurden bereits die Schwierigkeiten erwähnt, die sich bei der Deutung der Konzentrationsabhängigkeit von t_{lag} ergeben, da man innerhalb dieses Zeitraums mit verschiedenartigen Prozessen rechnen muß, die sowohl zeitlich parallel als auch nacheinander stattfinden. Ein Vergleich zeigt jedoch, daß die Verzögerungszeit in stärkerem Maße von der eingesetzten Proteinkonzentration abhängt als es beim Phalloporin und beim Staphylococcus- α -Toxin der Fall ist. Hier wurden Exponenten von -0.35 bzw. -0.4 gefunden. Dies ist wiederum ein Hinweis auf die verschiedenartigen Kanalbildungsmechanismen der beiden Amanita-Proteine und deutet auf eine mögliche Kooperativität bzw. Assoziation von Rubescensporinuntereinheiten bereits vor der Kanalbildung hin. t_{lag} ist jedoch im Gegensatz zu der Zeitkonstanten τ des exponentiellen Stromanstiegs unabhängig von der angelegten Membranspannung (Abb. 3.40). Man muß daher annehmen, daß diese Assoziation an der Grenzfläche von Membran- und Wasserphase stattfindet, an der die wechselwirkenden Untereinheiten das elektrische Feld nicht spüren. Es sind daher mindestens zwei Prozesse bei der Wechselwirkung von Rubescensporin zu unterscheiden: eine spannungsunabhängige Assoziation von Rubescensporinuntereinheiten an der Wasser-Membran-Grenzfläche sowie eine spannungsabhängige Assoziation bei der Bildung von leitfähigen Aggregaten in der Membran.

b.) Bei der doppeltlogarithmischen Darstellung des jeweils nach 10 Minuten erreichten Membranstromwertes I_{10} in Abhängigkeit von der Rubescensporinkonzentration zeigt sich, daß der Exponent der Konzentrationsabhängigkeit in Bereichen sehr kleiner Konzentrationen ($< 10^{-7}$ g Protein/ml) kleiner als 1 ist. Bei höheren Konzentrationen ergibt sich eine deutlich stärkere

Konzentrationsabhängigkeit. Durch eine Geradenanpassung der letzten drei Datenpunkte in Abb. 3.44 erhält man eine Steigung von 1,8, was wiederum ein Hinweis auf das Kooperieren mehrerer Untereinheiten bei der Kanalbildung ist. Man muß dabei berücksichtigen, daß es sich bei diesem Parameter wie beim N_{45} -Wert des Phalloporins (s.o.) um keine echte Gleichgewichtsgröße handelt und somit die Gleichgewichtseigenschaften einer solchen Kooperativität nur sehr ungenau wiedergegeben werden.

Die geringere Konzentrationsabhängigkeit im Bereich von $<10^{-7}$ g Protein/ml läßt sich damit erklären, daß die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens von Untereinheiten wegen ihrer sehr geringen Dichte in der Membran sehr klein ist und es daher nur zur Ausbildung von leitfähigen Kanalaggregaten geringer Größe kommen kann. Bei höheren Konzentrationen hingegen treffen die miteinander wechselwirkenden Untereinheiten in der Membran und/oder bereits an der Wasser-Membran-Grenzfläche sehr viel häufiger aufeinander und können dabei zu Aggregaten höherer Ordnung auswachsen.

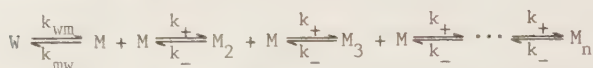
c.) Die Zunahme des Membranstroms durch Rubescensporin läßt sich anders als beim Phalloporin durch einen einfach exponentiellen Prozeß beschreiben, der formal der Gesetzmäßigkeit (Gl. 3.17)

$$I \sim e^{+t/\tau}$$

gehört. Die Zeitkonstante τ dieses exponentiellen Stromanstiegs ist neben der Spannung (Abb. 3.35a) von der Konzentration an Rubescensporin in der Wasserphase abhängig (Abb. 3.43). Je mehr Rubescensporin eingesetzt wird, desto schneller verläuft die exponentielle Zunahme der Membranleitfähigkeit; bei der doppeltlogarithmischen Auftragung gegen die eingesetzte Rubescensporinkonzentration wurde ein Exponent von -0.60 ermittelt (Gl. 3.22). Wie bei der doppeltlogarithmischen Darstellung von I_{10} gegen die Proteinkonzentration kann man das damit erklären, daß mit zunehmender Rubescensporinkonzentration in der Wasserphase auch die Dichte der miteinander wechselwirkenden Untereinheiten in der Membran zunimmt und die Wahrscheinlichkeit des Aufeinandertreffens solcher Elemente erhöht wird.

Die soweit vorliegenden Daten, vor allem die starke Konzentrationsabhängigkeit des Membranstroms I_{10} (s.o.), lassen erkennen, daß der Kanalbildung durch Rubescensporin bei neutralen und basischen pH-Werten kooperative Prozesse von miteinander wechselwirkenden Proteinuntereinheiten, etwa in Form einer Aggregation, zugrunde liegen müssen.

In Kap. 6.4 wird ein Modell eines solchen sequentiellen Aggregationsmechanismus dargestellt. Im einfachsten Fall läßt sich dieser durch eine kinetische Reaktionsgleichung der Form



beschreiben (s. Kap. 6.4; Gl. 6.31). Dabei ist W die Rubescensporinkonzentration in der wäßrigen Phase. M_2 , M_3 , ... M_n kennzeichnen die Rubescensporinoligomere, die durch Aufnahme eines Monomers M fortlaufend wachsen. k_+ und k_- bezeichnen die Geschwindigkeitskonstanten für die Hin- und Rückreaktion jedes einzelnen Aggregationsschrittes; k_{wm} und k_{mw} sind die Geschwindigkeitskonstanten für den Übergang von M aus der Wasserphase in die Membran.

Als interessante Folgerung ergibt sich aus diesem Schema, daß die Summe aller Rubescensporinoligomere in der Membranfläche bei einer gegebenen Konzentration W in der Wasserphase exponentiell mit der Zeit t anwächst (Gl. 6.42). Dies steht in guter Übereinstimmung mit der experimentell gefundenen exponentiellen Zeitabhängigkeit des Membranstroms rubescensporindotierter Membranen (Gl. 3.17).

Analog zum sequentiellen dreistufigen Inkorporationsmodell des Phalloporins (Gl. 6.1) läßt sich auch hier die Gültigkeit des vorgeschlagenen Reaktionsschemas durch einen Vergleich von theoretisch abgeleiteten und experimentell ermittelten quantitativen Daten überprüfen. Setzt man eine strikte Gültigkeit dieses Modells voraus, so läßt sich zeigen, daß die Zeitkonstante τ des exponentiellen Aggregationsprozesses umgekehrt proportional zu der eingesetzten Rubescensporinkonzentration sein muß (Gl. 6.43). In einer entsprechenden doppeltlogarithmischen Auftragung von τ erwartet man daher eine Geradensteigung und einen entsprechenden Exponenten von -1. Der experimentell ermittelte Exponent von -0.6 für die Zeitkonstante des Stromanstiegs weicht somit beträchtlich von dem theoretisch abgeleiteten Wert ab. Dies macht deutlich, daß das vorgeschlagene Aggregationsschema in der Form von Gl. 6.31 nur als eine grobe qualitative Beschreibung des Kanalbildungsmechanismus durch Rubescensporin betrachtet werden kann.

Als eine wesentliche Einschränkung muß zunächst geltend gemacht werden, daß sich die durch Gl. 6.42 angegebene Oligomerkonzentration strenggenommen nur dann mit dem zeitabhängigen Membranstrom korrelieren läßt, wenn alle ionenleitenden Oligomerformen auch identische Leitwerte besitzen. Die

Einzelkanaluntersuchungen des Rubescensporins zeigen, daß dies nicht erfüllt ist (Kap. 3.2.2). Ferner setzt das Schema voraus, daß sich die ionenleitenden Oligomere in ihrer Größe nur durch die Aufnahme bzw. Abgabe eines Monomers M ändern. Wahrscheinlicher ist jedoch, daß es bei hohen Proteinkonzentrationen in der Membran auch zu Verschmelzungen einzelner Oligomere kommen kann.

Diese Einschränkungen machen die Diskrepanz zwischen dem theoretisch zu erwartenden und dem experimentell ermittelten Wert des Exponenten für die Konzentrationsabhängigkeit der Zeitkonstante τ verständlich. Das Reaktionsschema in Gl. 6.31 ist aber zumindest ein geeignetes Hilfsmittel, um den Mechanismus, der der Kanalbildung durch Rubescensporin zugrunde liegt, zu veranschaulichen und besser zu verstehen.

Unter diesem Aspekt wird der Unterschied der beiden Kanalbildungsmechanismen des Phalloporins und des Rubescensporins deutlich: Das Schema des Rubescensporins (Gl. 6.31) beschreibt eine Oligomerisation von miteinander wechselwirkenden Elementen in der Membranfläche. Die Folge ist ein Membranstrom, der exponentiell mit der Zeit anwächst. Demgegenüber stellen Phalloporinkanäle nach dem vorgeschlagenen dreistufigen Einbauschema (Gl. 6.1) in der Membran völlig unabhängig voneinander funktionierende, zeitlich konstante Komplexe dar, die untereinander keine Wechselwirkung ausüben.

4.4 Perfusionsexperimente an phalloporin- und rubescensporindotierten Lipidmembranen

Die bisherige Diskussion der kanalbildenden Eigenschaften läßt den Schluß zu, daß Phalloporinkanäle in der Membran einheitlich strukturierte und nicht miteinander wechselwirkende Komplexe darstellen, während man beim Rubescensporin von einer Assoziation von Untereinheiten, sowohl bei der Einlagerung in die Membran als auch bei der Kanalbildung, ausgehen muß. Dies läßt sich auch am Verhalten des Membranstroms nach einer Perfusion des KammerSystems zeigen. Entfernt man nach einer gewissen Zeit das verbliebene Phalloporin aus der Wasserphase, so bleibt der Membranstrom auf dem einmal erreichten Niveau stehen. Das zeigt, daß die Zunahme des Membranstroms allein auf dem direkten Übertritt von Phalloporinkanälen aus der Wasser- in die Bilayerphase beruht. Einmal eingebaute Kanäle schalten völlig unabhängig voneinander und üben keine Wechselwirkungen untereinander aus. Ein spontaner Ausbau des Proteins zurück in die Wasserphase findet nicht statt.

Das Phänomen der spannungsinduzierten Inaktivierung bei niedrigen pH-Werten muß man davon getrennt betrachten. Dieses wird an anderer Stelle diskutiert (Kap. 4.5.2).

Ein entsprechendes Verhalten zeigen künstliche Lipidmembranen, die nach der von Schindler entwickelten Technik hergestellt werden (Kap. 2.2.1.2) und die eine definierte und zeitlich konstante Anzahl des kanalbildenden Porins aus *E. coli* enthalten (Schindler und Rosenbusch, 1978). Die konstante stationäre Leitfähigkeit dieser Membranen kann in direktem Zusammenhang mit der einheitlichen Struktur dieses Kanalbildners gesehen werden, die seit kurzem relativ gut aufgeklärt ist (Engel et al., 1985).

Mit Rubescensporin dotierte Membranen zeigen nach der Perfusion ein anderes Verhalten (Abb. 3.45). Der Membranstrom bleibt bei pH 7.2 nicht zeitlich konstant, sondern er steigt auch nach Entfernung des Kanalbildners aus der Wasserphase während der Dauer eines Experiments immer weiter, wenn auch langsamer, an. Selbst nach der Inaktivierung der leitfähigen Strukturen durch Umschalten auf positive Membranspannungen kommt es bei Zurückschalten auf negative Spannungen zu einem Wiederaufbau der Membranleitfähigkeit. Dieser kann nach dem Austauschen der Elektrolytlösung nur durch die Untereinheiten des Rubescensporins zustande kommen, die bereits vor der Perfusion in die Lipidmembran eingelagert wurden. Daß die Membranleitfähigkeit sogar über das unmittelbar vor der Perfusion erreichte Niveau anzusteigen vermag, zeigt, daß die Rubescensporinkanäle keine strukturell einheitliche und zeitlich konstante Form wie das Phalloporin haben, sondern im Laufe der Zeit zu Kanalaggregaten immer größeren Umfangs auswachsen. Die Membranleitfähigkeit hängt anders als beim Phalloporin nicht nur von der Anzahl der eingebauten Komplexe, sondern auch von dem immer weiter fortschreitenden, spannungsabhängigen Aggregationsprozeß ab.

Diesen Befund kann man anschaulich anhand des vorgeschlagenen Reaktionsschemas (Gl. 6.31) darstellen.

Wichtig ist hierbei die Feststellung, daß der Wiederanstieg der Leitfähigkeit der rubescensporindotierten Membran im Perfusionsexperiment nach einer Inaktivierung verlangsamt erfolgt (τ wird größer, s. Abb. 3.45). In Kap. 3.2.1.6 wurde dargestellt, daß die Zeitkonstante τ des Leitfähigkeitsanstiegs von der Rubescensporinkonzentration abhängt. Der verlangsamte Wiederanstieg läßt daher auf eine Verringerung der Grenzflächenkonzentration an Rubescensporin schließen, dadurch daß der Kanalbildner im inaktivierten Zustand in die wäßrige Phase zurückdiffundiert. Bei weiteren

Umschaltungen (± 100 mV) sollte τ daher ständig größer werden.

4.5 Einzelkanalverhalten

4.5.1 Phalloporin

Die Einzelkanalfluktuationen des Phalloporins wurden z.T. schon beschrieben (Wilmsen, 1983; Wilmsen et al., 1985). Für den inkorporierten, fluktuierenden Kanal kann man ein Modell mit insgesamt drei Zuständen zugrunde legen: ein leitender (R_o) und zwei nichtleitende Zustände (R_c und R_r), von denen einer als geschlossener Zustand innerhalb des Bursts angenommen wird (R_c), während der andere (R_r) die inaktiven Interburstintervalle umfaßt. Beide nichtleitenden Zustände lassen sich statistisch durch die unterschiedlich langen mittleren Aufenthaltsdauern unterscheiden.

In Kap. 4.6.1 wird die Korrelation zwischen der makroskopischen normierten Membranleitfähigkeit L und der Einzelkanaloffenwahrscheinlichkeit p_o durch ein eingeschränktes Reaktionsschema beschrieben, das sich auf eine Analyse ausschließlich des offenen und geschlossenen Zustands innerhalb der Bursts beschränkt. Dabei zeigt sich, daß die Spannungsabhängigkeit von L nicht durch den Interburstzustand beeinflusst wird, da sein Auftreten spannungsunabhängig ist.

Das Schaltverhalten des Phalloporins ist ähnlich dem einer Reihe von integralen Kanalproteinen in biologischen Membranen von Vertebratenzellen, deren Aktivität durch die Membranspannung sowie über spezifische Ionen und/oder Agonisten gesteuert wird (Sakmann und Neher, 1983). Insbesondere seien an dieser Stelle der Ca^{++} -abhängige K^+ -Kanal (Methfessel und Boheim, 1982; Barret et al., 1982) sowie der Acetylcholinrezeptorkanal (Sakmann et al., 1980) erwähnt. Das ähnliche Schaltverhalten bestärkt die Annahme, daß der Phalloporinkanale wie die physiologischen Kanäle tierischer Zellen einen membrangebundenen Komplex mit einer einheitlichen Struktur darstellt. In der Einleitung (Kap. 1.1.7) wurde der nikotinerge Acetylcholinrezeptorkanal als Beispiel einer solchen Funktionseinheit vorgestellt.

Das gelegentliche Auftreten von Unterstufen (Sublevels) in den Offenereignissen des Phalloporins widerspricht den Vorstellungen von einer einheitlichen Struktur nicht, da ähnliche Phänomene auch bei den erwähnten biologischen Kanaltypen beobachtet werden können (Hamill und Sakmann, 1981; Methfessel, 1983). Die Abb. 4.1 zeigt Beispiele dieser anomalen Ereignisse

beim Phalloporin und beim Ca^{++} -abhängigen K^+ -Kanal. Solche Unterstufen treten sehr selten auf (Häufigkeit beim Phalloporin $\ll$ 0.1 Prozent aller Offenereignisse). Sie werden als Übergänge der Kanalproteine zu Konformationen mit einem niedrigeren Leitwert gedeutet (Läuger, 1983). Urry et al. (1984) konnten zeigen, daß Umorientierungen von Aminosäureseitenketten innerhalb eines Ionenkanals den Transport von Ionen beeinträchtigen können.

Diese Analogien sind bemerkenswert, da das Phalloporin und die physiologischen Membrankanäle aus tierischen Zellen, vom biologischen Standpunkt aus betrachtet, eine sehr verschiedene Herkunft - Basidiomyceten und Vertebraten - haben.

Sowohl der Ca^{++} -abhängige K^+ -Kanal (Latorre et al., 1982) als auch das Phalloporin bevorzugen bei positiven Spannungen den offenen Zustand. Beide Kanäle werden durch ein spezifisches Ion aktiviert, wobei eine Erhöhung der H^+ - bzw. der Ca^{++} -Ionenkonzentration bei einer konstanten vorgegebenen Membranspannung die Wahrscheinlichkeit p_o des Kanals erhöht, den offenen Zustand anzunehmen.

Für diese Art von spannungs- und ionengesteuerten Kanälen läßt sich eine Äquivalenzbeziehung zwischen den beiden Parametern Spannung und Konzentration des aktivierenden Ions angeben. So zeigten frühere Messungen bei 37 °C und in SMPC-DOPS-Cholesterol-Bilayern (Wilmsen, 1983), daß eine Erhöhung der H^+ -Ionenkonzentration um eine Dekade zu einer Verschiebung der p_o -Kurven um 130 mV in negativer Richtung entlang der Spannungsachse führt (Abb. 1.8b). Mit anderen Worten: Eine Absenkung des pH-Wertes um eine Einheit hat auf die Einzelkanalkinetik dieselbe Wirkung wie eine Erhöhung der Membranspannung um 130 mV in die positive Spannungsrichtung.

Ein unterschiedliches Verhalten zeigt sich unter den in Abb. 3.17 aufgeführten Versuchsbedingungen (22 °C, POPC-DOPS-Cholesterol-Bilayer). Änderungen des pH-Wertes in Schritten von 0.5 bzw. 1.0 Einheiten führen zu unterschiedlichen Verschiebungen der Kurven entlang der Spannungsachse. So bewirkt die Änderung von pH 7.5 auf pH 6.5 eine Verschiebung der p_o -Kurve um lediglich etwa 40 mV (gemessen als Differenz der V_o -Werte), während der Schritt von pH 6.5 zu pH 6.0 zu einer Verschiebung von etwa 106 mV führt. Bei 37 °C und in SMPC-DOPS-Cholesterol-Bilayern ist die pH-Spannungs-Äquivalenzbeziehung der Kanalkinetik offenbar sehr viel einheitlicher.

Die Gründe für dieses Phänomen bleiben unklar. Es liegt nahe, eine Temperaturabhängigkeit von pK-Werten der für die Spannungs- und pH-Abhängigkeit verantwortlichen Gruppen in Betracht zu ziehen. Ein ähnliches Verhalten

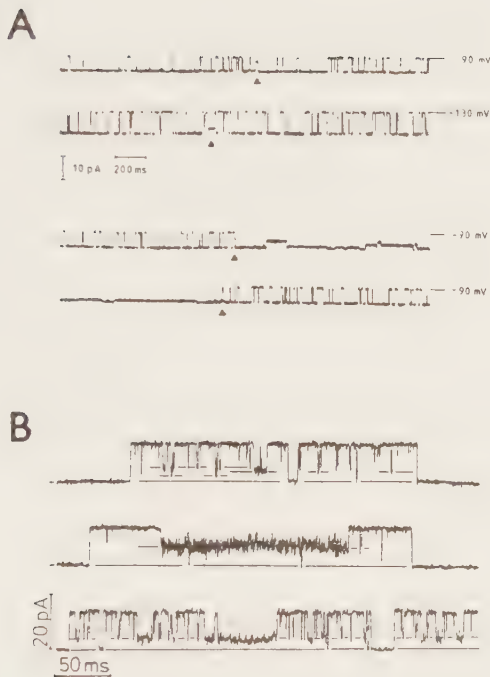


Abb. 4.1: Vergleichende Gegenüberstellung der Sublevels von Phalloporin und dem Ca²⁺-abhängigen K⁺-Kanal. Selten auftretende Öffnungsereignisse mit niedrigerem Leitwert beim Phalloporin (A) und beim Ca²⁺-abhängigen K⁺-Kanal in der Membran von embryonalen Muskelzellen (B, aus Methfessel, 1983). Diese anomalen Offenzustände können beim Phalloporin sowohl vom offenen (1. Spur, Pfeil) als auch vom geschlossenen Zustand aus angenommen werden (2. Spur, Pfeil). Bei niedrigen pH-Werten (hier pH 5.5) kommt es außerdem gelegentlich zu sehr langlebigen Offenzuständen, in denen verschiedene Leitwerte angenommen werden können (3. und 4. Spur, Pfeile markieren Beginn und Ende des langen Offenzustandes). Ähnliche Sublevels mit verminderten Leitwerten und übermäßig langen Lebensdauern treten auch beim Ca²⁺-abhängigen K⁺-Kanal auf (Patch-clamp-Ableitung).

wird für die Schaltladung unter den verschiedenen Versuchsbedingungen diskutiert (Kap. 4.6.1).

Kann man das Phalloporin einerseits der mittlerweile großen Familie der untersuchten wasserlöslichen Kanalbildner zuordnen, so unterscheidet es sich andererseits in seinen Ionen- und spannungsabhängigen Kanaleigenschaften doch stark von den anderen Vertretern dieser Gruppe. Charakteristisch für Einzelkanalfluktuationen des Diphtherie-Toxins (Kagan et al., 1981), der Colicine (Cleveland et al., 1983) und der Porine (Benz, 1984) ist das Fehlen eines ausgeprägten burstartigen Schaltens wie beim Phalloporin. Vielmehr treten sehr langlebige Offenzustände auf. Außerdem wird die Schaltkinetik in keinem nennenswerten Ausmaß durch Änderungen der H^+ - oder anderer Ionenkonzentrationen beeinflusst. Bezeichnenderweise stammt der bisher einzige pH- und spannungsabhängige membranintegrale Ionenkanal, der in künstliche Lipidmembranen inkorporiert werden konnte, aus der Membran einer Vertebratenzelle (Hanke und Miller, 1983), während die meisten wasserlöslichen Kanalbildner aus Prokaryontenzellen und Mitochondrien stammen. Unter diesem Aspekt muß man dem Phalloporin aufgrund seiner überraschenden Ähnlichkeiten mit vielen integralen Proteinkanälen biologischer Membranen unter den wasserlöslichen Kanalbildnern eine Sonderstellung einräumen.

4.5.2 Rubescensporin

Setzt man geringe Proteinkonzentrationen ein ($<10^{-8}$ g/ml), so lassen sich diskrete Einzelkanalfluktuationen des Rubescensporins auflösen. Wie beim Phalloporin kann man die makroskopische Leitfähigkeitserhöhung von Lipidmembranen somit auf elementare Öffnungs- und Schließereignisse Ionenleitender Kanäle zurückführen. Beiden Kanalbildnern ist das burstartige Auftreten der Einzelkanalaktivität eigen (Abb. 1.8a und 3.47).

Die Einzelkanalfluktuationen des Rubescensporins unterscheiden sich jedoch von denen des Phalloporins grundsätzlich durch das charakteristische Auftreten mehrerer Leitwertstufen innerhalb eines solchen Bursts bei sehr niedrigen und neutralen bis alkalischen pH-Werten (Abb. 3.46 und 3.47). Neben nichtleitenden Zuständen werden mindestens drei leitende Zustände angenommen, die in strikter Sequenz aufeinander folgen und deren Leitwerte keine ganzzahligen Vielfachen voneinander sind. Ein solches Fluktuationsverhalten ist unter anderem charakteristisch für eine Reihe kurzkettiger

Polypeptidantibiotika, bei denen gleichfalls ein Zusammenhang zwischen einer detergensartigen cytolytischen Wirkung und einer Kanalbildung in Lipidmembranen besteht (Kap. 1.3.2). Ihr Kanalbildungsmechanismus wird mittlerweile sehr gut verstanden und durch das sogenannte Barrel-stave-Modell beschrieben, das unter anderem für das Monazomycin (Finkelstein und Holz, 1973) und das Alamethicin (Boheim, 1974; Boheim et al., 1983) vorgeschlagen wurde. In diesem Modell, das detailliert in Kap.1.3.2 beschrieben wurde, findet der Gesamtdipolcharakter von aggregierenden, porenbildenden α -Helices Berücksichtigung, der bei einem in der Membran herrschenden elektrischen Feld die ausgeprägte Spannungsabhängigkeit der Kanalbildung bedingt.

Das Spektrum verschiedener Leitwertstufen, etwa von Alamethicinkanälen, entsteht durch die schnelle Veränderung der Anzahl solcher α -Helices, die ringförmig und senkrecht zur Membranebene angeordnet sind und dadurch in ihrer Mitte einen wassergefüllten transmembranären Kanal schaffen. Übergänge zwischen diesen unterschiedlichen Aggregationszuständen kommen durch einen spannungsabhängigen Flipflop einzelner Monomere zustande, die aufgrund ihrer relativ geringen molekularen Größe eine hohe Mobilität besitzen (Boheim et al., 1983). Dies führt unmittelbar zu der charakteristischen Sequenz von nicht ganzzahligen Leitwertstufen (Hanke und Boheim, 1980), wie sie auch bei den Einzelkanalfluktuationen des Rubescensporins auftreten.

Aufgrund der Ähnlichkeit in der Leitwertsequenz einzelner Kanäle darf man für das Rubescensporin einen ähnlichen Kanalbildungsmechanismus wie bei kanalbildenden Polypeptidantibiotika annehmen. Demnach sollten die membranüberspannenden Teile der eingebauten Rubescensporinmonomere eine α -helikale Struktur besitzen und senkrecht zur Membranfläche orientiert sein. Die aus mehreren transmembranären Helices aufgebauten Rubescensporinmoleküle sollten sich außerdem mehr oder weniger ringförmig zu Aggregaten variabler Größe aneinanderlegen können. Je nach Anzahl der so assoziierten Monomere entstehen dadurch wassergefüllte, ionenleitende Kanäle mit unterschiedlichen Durchmessern und elektrischen Leitwerten. Der Wechsel von einer Leitwertstufe zu einer anderen innerhalb eines Bursts (Abb. 3.46) ist somit die direkte elektrische Widerspiegelung der Aufnahme oder Abgabe eines Monomers in einem solchen Aggregat.

Gestützt wird diese Annahme dadurch, daß man für membranüberspannende Sequenzen von L-Aminosäuren gemeinhin eine α -helikale Struktur annimmt. Dies konnte zum ersten Mal explizit in einer eleganten Untersuchung der

dreidimensionalen Struktur des hydrophoben Membranproteins Bakteriorhodopsin nachgewiesen werden (Henderson und Unwin, 1975).

Eine derartige Interpretation des Einzelkanalverhaltens aufgrund des Barrel-stave-Modells steht zudem in ausgezeichnete Übereinstimmung mit dem Vielkanalverhalten des Rubescensporins. Es sei hier zum Beispiel auf das Verhalten perfundierter rubescensporinhaltiger Membranen hingewiesen, das stark auf einen Aggregationsmechanismus hindeutet (Kap. 4.4).

Wenn es sich bei den Rubescensporinmonomeren um höhermolekulare Proteinstrukturen handelt, die wesentlich größer sind als die Polypeptidantibiotika mit ihrer durchschnittlichen molekularen Masse von 2000-3000 D, so ist ein spannungsabhängiger, vollständiger Flipflop ganzer Moleküle aus energetischen Gründen unwahrscheinlich. In diesem Fall kann die beobachtete starke Spannungsabhängigkeit der Kanalbildung dadurch zustande kommen, daß das elektrische Feld in der Membran auf elektrische Dipole innerhalb von membranüberspannenden Molekülteilen Drehmomente ausübt. Je nach der Art der anliegenden Spannung könnten die Rubescensporinmonomere auf diese Weise eine für die Assoziation günstigere oder ungünstigere Orientierung einnehmen. Legt man das experimentell beobachtete Verhalten der Rubescensporinkanäle zugrunde, so wird die Orientierung der Monomere für eine Assoziation umso günstiger, je stärker negativ das elektrische Potential der cis-Seite gegenüber dem der trans-Seite ist. Umgekehrt nehmen die Monomere in Richtung zu positiveren Membranspannungen eine für die Aggregatbildung ungünstigere Orientierung ein, die Kanalbildungsrate nimmt entsprechend ab. Diese Vorstellungen machen es dann auch verständlich, daß bereits ausgebildete leitfähige Aggregate teilweise oder sogar vollständig desaggregieren, wenn man das Vorzeichen der anliegenden Membranspannung von negativ zu positiv wechselt. Das läßt sich unmittelbar an dem spannungsabhängigen Verhalten des Vielkanal- und des Einzelkanalsystems beobachten (Abb. 3.36 und 3.50): Ein bei negativer Spannung (-100 mV) induzierter Rubescensporinkanal verschwindet bei einem Wechsel der Spannungspolarität (+100 mV).

Bei der Diskussion der kanalbildenden Eigenschaften eines Membranproteins muß man als einen weiteren Punkt das Vorhandensein titrierbarer, elektrisch geladener Gruppen am Protein berücksichtigen. Setzt man einmal im Falle des Rubescensporins hypothetisch die Identität des kanalbildenden mit dem cytotisch wirksamen Protein voraus - wofür es durchaus Hinweise gibt (Kap. 4.8.2) - so liegt der isoelektrische Punkt der kanalbildenden Moleküle bei 4.9 (Seeger, 1980 b). Rubescensporin trägt dann bei basische-

ren pH-Werten negative, bei stärker sauren pH-Werten positive Nettoladungen, die bei der Aggregation kanalbildender α -Helices durch das Ausüben von elektrostatischen Anziehungs- oder Abstoßungskräften sicherlich eine Rolle spielen. Dafür spricht, daß innerhalb des untersuchten pH-Bereichs von 4-9 Übergänge zu höheren Leitwertstufen hauptsächlich im sehr sauren und im neutralen bis alkalischen Bereich beobachtet werden. Im mittleren pH-Bereich ($5 < \text{pH} < 6$), in dem das Protein keine oder nur eine geringere Nettoladung als in den beiden Extrembereichen trägt, wird typischerweise nur die zweite Leitwertstufe angenommen (Abb. 3.47). Höhere Stufen treten dann praktisch nicht in Erscheinung, die kleinere 1. Stufe nur selten. Daraus folgert, daß es zwischen den kanalbildenden α -Helices neben einer Van-der-Waals-Wechselwirkung auch zu elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen geladenen Resten des Proteins kommen muß, damit sich größere Aggregate ausbilden können. Sind die kanalbildenden Untereinheiten elektrisch weitgehend neutral, so bilden sie stabile Aggregate, und zwar bevorzugt dasjenige mit dem energetisch günstigsten Zustand.

Tragen die Moleküle jedoch starke Nettoladungen, so können sie ihren Aggregationszustand eher ändern, weil die Aufnahme oder die Abgabe von Untereinheiten in dem Oligomer energetisch erleichtert ist.

In diesem Zusammenhang ist es hilfreich, das für das Rubescensporin vorgeschlagene sequenzielle Kanalbildungsschema zu betrachten (Kap. 6.4, Gl. 6.31). Entsprechend diesem Modell verursacht die fortlaufende Aggregation von kanalbildenden Monomeren in der Membran einen mit der Zeit exponentiell anwachsenden Membranstrom (Gl. 3.17). Man setzt dabei voraus, daß die Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Aggregationsschritte annähernd identisch sind. Würde jedoch an einer Stelle ein energetisch besonders günstiger und stabiler Zustand erreicht, so käme die Aggregationskette von Rubescensporinmonomeren hier zum Stillstand.

Dies wurde in dem in Frage kommenden mittleren pH-Bereich tatsächlich beobachtet (Abb. 3.41). Bei pH 5.50 wächst der makroskopische Membranstrom im Gegensatz zu den extremeren pH-Bereichen nicht unendlich an, sondern er erreicht einen stationären Endwert.

Unter diesen Bedingungen ist das Vielkanalverhalten des Rubescensporins dem des Staphylococcus- α -Toxins sehr ähnlich. Dieses aggregiert, je nach Versuchsbedingungen, in der Membran gleichfalls zu einer bevorzugten Aggregatform, etwa zum Hexamer, während Pentamere und Heptamere im weitaus geringeren Umfang vorliegen. Auch hier erreicht der Membranstrom einen

echten stationären Endwert (Belmonte et al., 1986).

Ein weiteres wesentliches Charakteristikum von Rubescensporinkanälen ist die starke pH-Abhängigkeit der Leitwerte der einzelnen Leitwertstufen (Abb. 3.48). Die Leitwerte der ersten drei leitenden Stufen nehmen zu alkalischen pH-Werten hin S-förmig zu, wobei für die einzelnen Stufen die Sättigungswerte in unterschiedlichen pH-Bereichen erreicht werden.

Eine mögliche Erklärung für die außerordentlich starke pH-Abhängigkeit der einzelnen Leitwerte ist, daß die Mündung des jeweiligen Kanalaggregats je nach pH-Wert eine unterschiedlich starke elektrische Nettoladung trägt. Wegen des Gouy-Chapman-Effekts kommt es infolgedessen im Bereich des Kanaleingangs zu einer Anreicherung von Gegenionen und zu einer Verarmung an Co-Ionen. Bei einem kationenselektiven Kanal erwartet man deshalb, daß sich sein Leitwert erhöht, wenn die negative Nettoladung im Bereich der Kanalmündung zunimmt, da sich Kationen dort anreichern und verstärkt in das Kanallumen eintreten können. Entsprechend führt eine Verringerung der negativen Überschuladung am Kanaleingang, etwa durch eine Titration der beteiligten geladenen Gruppen bei einer Erhöhung der H^+ -Ionenkonzentration, zu einer Verminderung des Leitwertes. Der Rubescensporinkanal zeigt ein solches Verhalten, und man darf daher auf eine Kationenselektivität schließen. Umgekehrt erwartet man bei einem anionenselektiven Kanal in Richtung zu alkalischen pH-Werten aufgrund des Gouy-Chapman-Effekts eine ~~Verminderung~~ des Leitwertes, weil die Umgebung der Kanalmündung wegen der Verringerung der negativen Überschuladung an Anionen verarmt.

Die Titrationskurven der Einzelkanalleitwerte zeigen pK-Werte im Bereich von 5.5-6.0. Berücksichtigt man die negativen Oberflächenladungen der künstlichen Lipidmembranen, die zu einer Verschiebung des pH-Wertes unmittelbar an der Bilayeroberfläche um 0.7 pH-Einheiten in die saure Richtung führt (Appell et al., 1979; Wilmsen, 1983), erhält man reale pK-Werte zwischen 4.8 und 5.3. Legt man als Erklärung für die pH-Abhängigkeit des Leitwertes den Gouy-Chapman-Effekt zugrunde, so markieren diese Werte den pH-Bereich, in dem in der Umgebung der Kanalmündung der Rubescensporinkanäle ein annähernd ausgeglichenes Ladungsverhältnis herrscht.

Es ist natürlich nicht auszuschließen, daß eine Veränderung des Ladungszustandes im Kanalinneren bei einer Variation des pH-Wertes einen zusätzlichen Einfluß auf die Ionenleitung und somit auf den Leitwert ausübt.

Kann man beim Alamethicin von den Leitwerten in einer groben Abschätzung auf den Kanaldurchmesser und somit auf die Anzahl der Untereinheiten des

Aggregats schließen (Hanke und Boheim, 1980), so ist dies beim Rubescensporin wegen der starken Leitwert-pH-Abhängigkeit nicht möglich. Vergleichbare Verhältnisse sollten jedoch am ehesten gegeben sein, wenn das Rubescensporin an seinem isoelektrischen Punkt eine möglichst geringe Nettoladung hat. Der Leitwert der zweiten Rubescensporinkanalstufe beträgt hier etwa 160-170 pS und ist am ehesten mit der zweiten Stufe der Alamethicinpore mit 280 pS zu vergleichen (erste Stufe: 19 pS, dritte Stufe: 1300 pS), die aus 4-5 α -Helices gebildet wird (Hanke und Boheim, 1980).

Eine deutliche pH-Abhängigkeit von Einzelkanalleitwerten wurde ausführlich bisher nur im Falle des Colicins A (Pattus et al., 1983 a) und des Colicins EI beschrieben (Raymond et al., 1985). Der Leitwert des Colicins A variiert im pH-Bereich von 5-9 zwischen etwa 5 und 10-15 pS in 1 M NaCl (Collarini et al., 1987) mit einem effektiven pK-Wert von 6.0. Die pH-Abhängigkeit der Colicinleitwerte ist bei weitem nicht so stark wie im Fall des Rubescensporins. Sie geht einher mit einer pH-abhängigen Ionenselektivität. Beim Rubescensporin vermag dagegen der Leitwert der zweiten Stufe im pH-Bereich von 4-9 um einen Faktor von 60 zu variieren.

Interessanterweise werden auch beim Colicin A wie beim Rubescensporinkanal Übergänge zu höheren Leitwertstufen beobachtet, die mindestens das 6fache der Einheitsleitwertstufe betragen (Collarini et al., 1987). Diese großen Stufen werden nur bei hohen Colicin-A-Konzentrationen beobachtet und könnten ebenfalls durch eine Aggregation von Untereinheiten zustande kommen.

Mit seinen ausgeprägt stark pH-abhängigen Einzelkanalleitwerten unterscheidet sich das Rubescensporin in markanter Weise vom Phalloporin, dessen Einzelkanalleitwert im pH-Bereich von 4-9 nahezu konstant ist (Abb. 3.30).

4.6 Makroskopische elektrische Eigenschaften phalloporin- und rubescensporindotierter Lipidmembranen

4.6.1 Korrelation zwischen makroskopischer Membranleitfähigkeit phalloporindotierter Membranen und Einzelkanalverhalten

Mit Hilfe der in Kap. 2.2.2.3 dargestellten Perfusionsmethode lassen sich künstliche Lipidmembranen herstellen, die eine große und zeitlich konstante Anzahl von schaltenden Phalloporinkanälen enthalten. Dabei macht man sich den spontanen Einbau des Phalloporins bei niedrigen pH-Werten zunutze, der um mehrere Größenordnungen effektiver ist als die spannungsinduzierte Aktivierung einzelner Kanäle bei neutralem pH. Die Anzahl der inkorporierten Kanäle bleibt auch bei einem vorsichtigen Austausch der Elektrolytlösungen und einer Veränderung des pH-Wertes konstant. Dies erlaubt eine Untersuchung der elektrischen Eigenschaften des derart modifizierten Lipidbilayers auch bei neutralen und basischen pH-Werten, die bisher an der geringen Einbaurate in diesem pH-Bereich gescheitert war.

Der Gesamtstrom durch eine künstliche Lipidmembran mit einer großen Anzahl von Phalloporinkanälen zeigt bei neutralem pH-Wert eine deutliche Gleichrichtereigenschaft (Abb. 3.15). Der Beitrag des reinen Lipidbilayers zum Gesamtstrom ist dabei wegen seiner sehr niedrigen Eigenleitfähigkeit ($\approx 10^{-8}$ S/cm²) vernachlässigbar klein, so daß die elektrischen Eigenschaften der Membran in erster Linie durch die elektrischen und kinetischen Eigenschaften der Phalloporinkanäle bestimmt werden. Die Gleichrichtereigenschaft einer phalloporindotierten Membran drückt sich in der spannungsabhängigen Gesamtleitfähigkeit g des Systems aus (Abb. 3.16), die in positiver Spannungsrichtung einen Maximalwert $g_{\max}$ erreicht und zu negativen Spannungen S-förmig gegen einen Minimalwert $g_{\min}$ strebt. Diese ausgeprägte Polarität zeigt, daß auch bei der spontanen Inkorporation des Phalloporins bei niedrigen pH-Werten der Einbau in die Membran gerichtet erfolgt und alle Kanäle geometrisch einheitlich zur Membranfläche orientiert sind. Ein gerichteter Einbau mit derselben Polarität wurde bereits bei der spannungsinduzierten Aktivierung einzelner Phalloporinkanäle bei neutralem pH beobachtet. Dabei zeigten mehr als 98 Prozent aller Kanäle eine Orientierung, bei der eine Aktivitätserhöhung in der positiven Spannungsrichtung erzielt wird; bei weniger als 2 Prozent lag jeweils die umgekehrte Ausrichtung vor. Das ist ein klares Indiz dafür, daß

Phalloporinkanäle zunächst an die Membran adsorbieren und erst eine bestimmte Orientierung finden müssen. Dabei ragt wahrscheinlich ein bestimmtes hydrophobes Molekülteil, ein *binding site*, teilweise in die Kohlenwasserstoffmatrix des Bilayers hinein. Aus diesem ausgerichtet-adsorbierten Zustand heraus erfolgt dann unmittelbar die vollständige und irreversible Einlagerung in den Bilayer und die Aktivierung zum fluktuierenden Kanal. Der Schluß liegt nahe, daß dieses für die Ausrichtung an der Membran verantwortliche *binding site* in enger Verbindung mit der titrierbaren Gruppe am Kanalkomplex steht, die die spontane, pH-abhängige Inkorporation von Phalloporin steuert.

Diese Vorstellung steht in gutem Übereinklang mit dem vorgeschlagenen dreistufigen Inkorporationsschema für das Phalloporin (Kap.6.1), in dem ein solcher adsorbierter Zustand des Kanalbildners an der Wasser-Lipid-Grenzfläche Berücksichtigung findet.

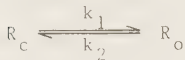
Ein gerichteter Einbau ist charakteristisch für eine Reihe von wasserlöslichen Kanalbildnern, die eine einheitliche Struktur aufweisen. So zeigen einige kanalbildende Cytolysine in künstlichen Lipidmembranen ebenfalls ein gerichtetes, spannungsabhängiges Verhalten, wie z.B. das Seeanemonen-Toxin (Varanda und Finkelstein, 1980), das Diphtherie-Toxin (Kagan et al., 1981) und die Colicine A und E1 (Schein et al., 1978; Raymond et al., 1985). Mit diesen Toxinen dotierte Bilayer nehmen wie beim Phalloporin ihre maximale Leitfähigkeit an, wenn ihre Zugabeseite (cis) auf ein positives Potential geklemmt wird.

Die Gesamtleitfähigkeit phalloporindotierter Membranen weist neben der Spannungs- auch eine deutliche pH-Abhängigkeit auf (Abb. 3.17). Eine Absenkung des pH-Wertes führt zu einer Verschiebung der sigmoiden Kurven entlang der Spannungsachse zu negativen Spannungswerten. Ein Vergleich mit den p_0 -Kurven einzelner Phalloporinkanäle unter den identischen Versuchsbedingungen zeigt die gute Korrelation beider Parameter (Abb. 3.17). Die Membranleitfähigkeit wird immer dann maximal, wenn sich die Einzelkanäle praktisch nur noch im offenen Zustand befinden ($p_0 = 1$) und verschwindet, wenn die Kanäle zu negativeren Membranspannungen hin bevorzugt im geschlossenen Zustand sind ($p_0 = 0$). Die entsprechenden Werte der Mittenspannungen V_0 , bei denen jeweils $L = 0.5$ bzw. $p_0 = 0.5$ ist, unterscheiden sich nur um wenige mV, was im Bereich der experimentellen Schwankungen liegt.

Die Korrelation beider Parameter läßt sich genauer mit dem in Kap. 1.1.5 zugrunde gelegten 2-Zustands-Modell für einfache Membrankanäle überprüfen.

Dort wurde bereits dargelegt, daß für eine Auswertung der Einzelkanalkinetik des Phalloporins eine Analyse ausschließlich innerhalb der Bursts ausreichend ist. Man läßt daher in dem 3-Zustands-Modell des Phalloporins (Gl. 1.14) die langsame Kinetik des dritten Kanalzustandes, der nicht-leitenden Interburstperioden, außer acht.

Diesem Modell entsprechend, soll das Phalloporin zwischen dem geschlossenen Zustand R_c und dem offenen Zustand R_o fluktuieren (Gl. 1.2):



Die Gleichgewichtskonstante für diesen Prozeß ist gegeben durch die Gl. 1.7 und 1.10:

$$K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{p_o}{p_c}$$

Für spannungsabhängige Membrankanäle gilt die thermodynamische Beziehung (Kap. 1.1.6; Gl. 1.15):

$$K = e^{-(\Delta G_o + zFV)/RT}$$

Dabei ist zFV der durch das elektrische Feld in der Membran beeinflussbare Anteil der Energiedifferenz zwischen den beiden Kanalzuständen. Die formale Ladung $z \cdot e$ gibt die Schaltladung (gating charge) an (Kap. 1.1.6). Ihr Vorzeichen bezieht sich konventionsgemäß auf die elektrische Nettoladung, die bei der Öffnungsreaktion von der trans- zur cis-Seite transferiert wird. Für den Phalloporinkanal konnte gezeigt werden, daß beim Öffnungsvorgang eine negative Ladung in die Richtung der cis-Seite verschoben wird (Wilmsen et al., 1985). Der Konvention gemäß trägt die Schaltladung des Phalloporinkanals somit ein negatives Vorzeichen.

Um eine Beziehung für die makroskopische g - V -Kurve herzuleiten, stellt man zunächst fest, daß die Gesamtleitfähigkeit einer Lipidmembran mit N eingebauten Phalloporinkanälen die Summe aus der Minimalleitfähigkeit g_{min} und der spannungsabhängigen Leitfähigkeit der Membran, die durch die Kanäle beigesteuert wird, ist (Gl. 3.4):

$$g = g_{min} + N \Lambda p_o$$

Dabei ist Λ der Einzelkanalleitwert und p_o die spannungsabhängige Wahrscheinlichkeit des Einzelkanals, sich im offenen Zustand aufzuhalten. Unter der Annahme, daß sich die Kanäle bei jeder Meßspannung im Gleichgewicht befinden, läßt sich die Offenwahrscheinlichkeit p_o als das Verhältnis der offenen Kanäle N_o zur Gesamtzahl N der Kanäle angeben:

$$p_o = \frac{N_o}{N} \quad (\text{Gl. 4.1})$$

Die Offenwahrscheinlichkeit eines spannungsabhängigen Kanals läßt sich mit Gl. 1.10 und Gl. 1.15 (Kap. 1.1.5) ausdrücken:

$$p_o = \left[1 + e^{(\Delta G_o + zFV)/RT} \right]^{-1} \quad (\text{Gl. 4.2})$$

Gl. 3.4 lautet somit umgeformt:

$$g = g_{\min} + N\Lambda \left[1 + e^{(\Delta G_o + zFV)/RT} \right]^{-1} \quad (\text{Gl. 4.3})$$

Die Auftragung dieser Gleichung liefert eine S-förmige Kurve, wie sie in Abb. 3.16 dargestellt ist. Ihre Steigung und Position entlang der Spannungsachse wird durch die beiden Parameter ΔG_o und z bestimmt.

Für die Auswertung der experimentellen Daten ist es sinnvoll, die Gleichung zu normieren. Sie kann dann auch auf g -V-Kurven verschiedener Membranen mit unterschiedlichen absoluten Leitfähigkeiten angewandt werden.

Dazu erkennt man zunächst, daß gilt:

$$N\Lambda = g_{\max} - g_{\min} \quad (\text{Gl. 4.4})$$

Als normierte Membranleitfähigkeit L wird definiert (Gl. 3.5):

$$L = \frac{g - g_{\min}}{g_{\max} - g_{\min}}$$

Eine Darstellung dieser Kurven bei verschiedenen pH-Werten ist in Abb. 3.17 gegeben. Man sieht, daß L Werte zwischen 0 und 1 annehmen kann. Mit den Gl. 4.3, 4.4 und 3.5 erhält man:

$$L = \left[1 + e^{(\Delta G_o + zFV)/RT} \right]^{-1} \quad (\text{Gl. 4.5})$$

Man beachte, daß diese Beziehung äquivalent zu Gl. 4.2 ist. Weitere Umformung liefert:

$$\frac{1-L}{L} = e^{(\Delta G_0 + zFV)/RT} \quad (\text{Gl. 4.6})$$

Ein Vergleich mit Gl. 1.15 zeigt, daß offenbar der Zusammenhang gilt:

$$\ln K = \ln \frac{L}{1-L} = -z \frac{F}{RT} \cdot V - \frac{\Delta G_0}{RT} \quad (\text{Gl. 4.7})$$

Zusammen mit Gl. 1.16 erhält man schließlich:

$$\ln K = \ln \frac{L}{1-L} = -z \frac{F}{RT} (V - V_0) \quad (\text{Gl. 4.8})$$

wobei V_0 als die Mittenspannung bezeichnet wird (Kap. 1.1.6).

Diese Beziehung ist in dieser Form zunächst weniger anschaulich als die ursprünglich gewählte lineare Auftragung von L . Ihr Vorteil ist aber, daß man die Gleichgewichtskonstante K direkt als eine Funktion der Membranspannung angeben und den zugrunde liegenden physikochemischen Sachverhalt deutlicher herausstellen kann.

Man kann zeigen, daß diese Betrachtungen auch für Einzelkanäle gelten, die neben den Zuständen R_0 und R_c einen langlebigen Interburstzustand R_r annehmen können, wenn die Verteilungen zwischen den Burst- und Interburstintervallen spannungsunabhängig sind. Bereits in der Diplomarbeit (Wilmsen, 1983) konnte gezeigt werden, daß der Phalloporinkanal diese Bedingung erfüllt.

Zusammen mit Gl. 1.10 haben wir nun die Möglichkeit, mit den Gleichgewichtskonstanten die Werte für die Schaltladung unabhängig voneinander für das Viel- und das Einzelkanalsystem zu ermitteln. Entsprechend sind beide Darstellungen in der Abb. 4.2a gezeigt. Sowohl für das Viel- als auch für das Einzelkanalsystem ergibt sich mit guter Näherung ein, nach Gl. 4.8 erwarteter, linearer Zusammenhang. Das zeigt, daß sich sowohl das mikroskopische Einzel- als auch das makroskopische Vielkanalverhalten des Phalloporins hinreichend gut mit dem zugrunde gelegten, eingeschränkten 3-Zustands-Modell vereinbaren läßt.

Die Differenzen der V_0 -Werte für die L - und p_0 -Kurven zeigen, daß bei pH 6.0 die Verschiebung nur 1 mV beträgt (Kap. 3.1.2.3). Bei den pH-Werten 7.5 und 6.5 sind die L -Kurven gegenüber ihren p_0 -Kurven nach links um 4 bzw. 18

mV verschoben. Man darf annehmen, daß diese Differenzen auf experimentellen Schwankungen beruhen.

Aus den Steigungen der Geraden wurden für beide Systeme die jeweiligen Schaltladungen ermittelt. Die Werte von z schwanken in dem untersuchten pH-Bereich von 5.5–7.5 zwischen -0.56 und -0.91 als Bruchteile der Elementarladung e . Formal wird also bei der Öffnungsreaktion des Kanals eine negative Nettoladung über die Membran von der trans- zur cis-Seite verschoben. Die Punkte der $\ln(L/1 - L)$ -Kurve bei pH 5.5 wurden in dem Spannungsbereich durch eine Gerade angepaßt, in dem noch keine spannungsinduzierte Inaktivierung von Phalloporinkanälen stattfindet ($V > -120$ mV, s. Kap. 3.1.3). Die Abb. 4.2b stellt die Werte für z in Abhängigkeit vom pH-Wert dar. Es fällt auf, daß die Schaltladung sowohl beim Viel- als auch beim Einzelkanalverhalten im pH-Bereich von 6.0–6.5 einen Minimalwert von -0.57 bis -0.58 bzw. -0.56 annimmt und sowohl in alkalischer als auch saurer Richtung größer wird (bei pH 7.5: $z = -0.66$ und -0.62 ; bei pH 5.5: $z = -0.91$ und -0.89). Eine plausible Erklärung dafür ist, daß sich der Gesamtladungszustand des Kanalproteins bei einer Variation des pH-Wertes ändert. Dabei fällt in beiden Systemen die starke Zunahme von z beim Schritt von pH 6.0 zu pH 5.5 auf. Die Zunahme der negativen Schaltladung bei pH 5.5, bei dem man aufgrund der höheren Protonenkonzentration eine mehr positive Gesamtladung des Kanals erwartet, ist nur scheinbar widersprüchlich, da z nur rein formal die Nettoverschiebung einer elektrischen Ladung anzeigt. Die Änderung der z -Werte mit dem pH-Wert könnte darauf beruhen, daß in diesem pH-Bereich die Protonierung einer Seitengruppe am Kanal stattfindet und damit die Ladungsasymmetrie des Kanals zwischen cis- und trans-Seite erhöht wird.

Frühere Einzelkanaluntersuchungen zur Kinetik des Phalloporins (Wilmsen, 1983) in einem anderen Lipidsystem und bei höherer Temperatur (37°C) lieferten für die Schaltladung Werte von $z = -0.71 \pm 0.02$ in einem pH-Bereich zwischen 5.5 bis 8.1. Dieser Wert liegt innerhalb der oben angegebenen Grenzen. Eine ausgeprägte pH-Abhängigkeit für z wurde damals nicht festgestellt. Das mag darauf zurückzuführen sein, daß die pK-Werte der beitragenden Gruppen bei der um 15°C höheren Temperatur in andere pH-Bereiche verschoben sind. Ferner ist ein Einfluß der Lipidumgebung auf das Kanalmolekül nicht auszuschließen, aber weniger wahrscheinlich. So wurde damals als Phosphatidylcholin das 1,3-SMPC verwendet, das sich vom 1,2-POPC in seiner höheren Phasenumwandlungstemperatur (29°C gegenüber 3°C) sowie durch die ungewöhnliche 1,3-Stellung der Fettsäurereste unterscheidet.

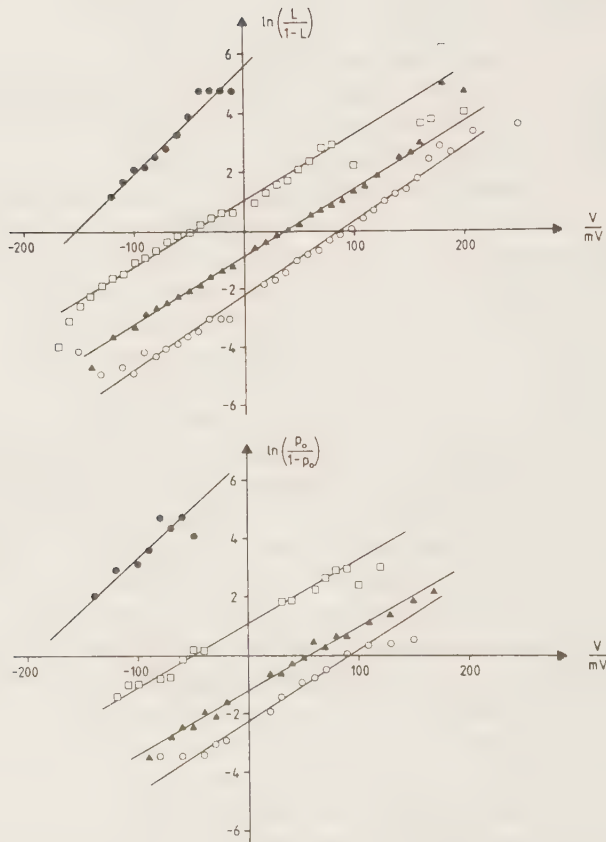


Abb. 4.2a: Die Darstellung von $\ln(L/1-L) = \ln K$ und $\ln(p_o/1-p_o) = \ln K$ als Funktion der Spannung. Die Werte wurden mit denselben Symbolen aus der Abb. 3.17 übernommen:

● = pH 5.5; □ = pH 6.0; ▲ = pH 6.5; ○ = pH 7.5

In beiden Fällen lassen sich die Werte gut mit einer linearen Abhängigkeit gemäß Gl. 4.8 und Gl. 1.10 beschreiben. Aus den Geradensteigungen ergeben sich die jeweiligen Werte für die Schaltladungen z (gating charges) in Einheiten von $RT/F = 25.4$ mV. Die nachfolgende Abb. 4.2b stellt die in den Viel- und Einzelkanalmessungen ermittelten Werte für z in Abhängigkeit vom pH-Wert dar. Die $\ln(L/1-L)$ -Kurve bei pH 5.5 wurde in dem Spannungsbereich durch eine Gerade angepaßt, in dem keine spannungsinduzierte Inaktivierung von Phalloporinkanälen eintritt ($V > -120$ mV).

Zum Vergleich sei eine Auswahl der Schaltladungen verschiedener Membrankanäle angegeben. Für das Colicin A, das hinsichtlich des pH-abhängigen Einbaus in Lipidmembranen Gemeinsamkeiten mit dem Phalloporin aufweist, wurde ursprünglich eine Schaltladung von -5 bis -7 angegeben (Schein et al., 1978). Neuere Untersuchungen ergaben, daß Colicin A in zwei Konformationen vorliegen kann, von denen die eine bei basischen, die andere bei sauren pH-Werten vorherrscht (Collarini et al., 1987). Für beide Formen des Colicins A wurden Schaltladungen von -4 bzw. -10 gefunden. Colicin-A-haltige Lipidmembranen sind also sehr viel stärker spannungsabhängig als im Fall von Phalloporin. Der Grund für die sehr hohen Schaltladungen mag in der Struktur der Colicinkanäle zu suchen sein, für die mittlerweile detaillierte Modelle vorgeschlagen wurden und die sich sämtlich durch eine antiparallele Anordnung von 5-8 α -helikalen Segmenten auszeichnen (Guy, 1983; Davidson et al., 1984 a; Pattus et al., 1985). Die hohen z-Werte könnten in diesem Fall durch die Verschiebung ganzer geladener Molekülteile über die Membran beim Öffnen und Schließen des Kanals zustande kommen. Die Schaltladung des Phalloporinkanals ist eher vergleichbar mit der des K^+ -selektiven Kanals aus der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums (Labarca et al., 1980). Vielkanalmessungen ergaben hier einen Wert von $z = -1.1$.

Bei der Untersuchung der Einzelkanalkinetik eines Cl^- -selektiven Kanals aus dem elektrischen Organ von *Torpedo californica*, der mit dem Phalloporin die durch H^+ -Ionen gesteuerte Kinetik gemeinsam hat, wurde ein Wert von $z = -1.0$ gefunden (Hanke und Miller, 1983).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die makroskopische, spannungsabhängige Leitfähigkeit phalloporindotierter Membranen in erster Linie durch die spannungsabhängige mikroskopische Einzelkanalkinetik bestimmt wird. Es wurde eine pH-abhängige Verschiebung der Schaltladung beobachtet, die sowohl im Viel- als auch im Einzelkanalsystem auftritt, wobei die gefundenen Werte für z in beiden Systemen eine gute Übereinstimmung zeigen.

Die Korrelation der makroskopischen Vielkanalleitfähigkeit und der spannungsabhängigen Offenwahrscheinlichkeit des Einzelkanals ist nicht generell zu finden: Manche Membranen erregbarer Zellen erhalten eine Gleichrichtereigenschaft durch die Spannungsabhängigkeit des Einzelkanalleitwertes. Ein Beispiel hierfür ist der sog. "einwärts gleichrichtende" (inwardly rectifying) K^+ -Kanal (Thompson und Aldrich, 1980; Kameyama et al., 1983; Sakmann und Trube, 1984; Kurachi, 1985).

4.6.2 Inaktivierungsexperimente mit Phalloporin

Die Leitfähigkeit phalloporindotierter Lipidmembranen, die sich nach einer Perfusion in einer phalloporinfreien Elektrolytlösung befinden, nimmt bei pH-Werten < 5.5 und bei Spannungen von $V < -120$ mV stärker ab als aufgrund der Einzelkanalkinetik zu erwarten ist (Abb. 3.17). Bei Spannungssprüngen zu Spannungen von $V < -120$ mV nimmt dann nicht nur die Offenwahrscheinlichkeit p_0 ab, sondern die Einzelkanalaktivität inaktiviert vollständig (Abb. 3.23).

Man kann diesen Inaktivierungsprozeß als einen einfach exponentiellen Vorgang beschreiben. Seine Reaktionsgeschwindigkeit ist abhängig von der in der Membran herrschenden elektrischen Feldstärke (Abb. 3.22).

Die Reversibilität dieser spannungsinduzierten Inaktivierung, die Recovery, ist dagegen abhängig vom pH-Wert. Bei pH 5.5 ist die Inaktivierung vollständig irreversibel, da nach dem Zurückschalten auf eine nicht inaktivierende Spannung die ursprüngliche Leitfähigkeit nicht wieder erreicht wird. Bei pH 4.5 wurde dagegen eine 81prozentige, bei pH 4.0 eine praktisch 100prozentige Recovery erzielt. Wie die spannungsinduzierte Inaktivierung läßt sich die pH-abhängige Recovery als ein einfach exponentieller Prozeß beschreiben. Sie verläuft bei positiven Membranspannungen schneller als bei negativen. Die Abb. 3.13 demonstriert, daß der Membranstrom nach einer Perfusion zeitlich konstant ist. Der Wiederanstieg der Membranleitfähigkeit kann deshalb nicht auf einem lateralen In-die-Membran-Diffundieren von Phalloporin, das zuvor außerhalb an dem Septum adsorbiert war, beruhen. Die Recovery kann somit nur durch die zuvor inaktivierten Kanäle hervorgerufen werden, die in einem zeitabhängigen Prozeß reaktiviert werden.

Solche spannungsinduzierten Inaktivierungen sind charakteristisch für eine Reihe von biologischen Kanälen, die z.B. an der Erregungsfortleitung an der Membran von Nerven- und Muskelzellen beteiligt sind. Der Na^+ -Kanal, dessen spannungsabhängige Inaktivierung ausführlich am Tintenfischaxon untersucht wurde (Hodgkin und Huxley, 1952), ist ein Vertreter dieser Kanäle.

Für den Phalloporinkanal bieten sich zwei Mechanismen an, die eine spannungsabhängige Inaktivierung und die pH-abhängige Recovery erklären können. Die Tatsache, daß sowohl die spannungsinduzierte Inaktivierung als auch die Recovery als einfach exponentielle Prozesse beschrieben werden können (Reaktionen erster Ordnung), zeigt, daß der Kanal bei diesen Vorgängen nur zwischen zwei Zuständen wechselt.

Zum einen kann eine Erhöhung der elektrischen Feldstärke an einem fest in der Membran verankerten Kanal Veränderungen, etwa Konformationsänderungen, hervorrufen, die ihn vollständig inaktivieren. Das Molekül bleibt aber vollständig in der Membran inkorporiert. Liegt eine ausreichend hohe Konzentration von Protonen an der Membran vor, so kann der Kanal bei reduzierter elektrischer Feldstärke wieder spontan in die funktionsfähige Konformation zurückkehren.

Als Alternative bietet sich an, daß der Phalloporinkanal bei niedrigen pH-Werten eine höhere (positive) Nettoladung trägt. Bei ausreichend hohen Feldstärken wirken so starke elektrostatische Kräfte auf den Kanalkomplex ein, daß dieser als Ganzes aus dem Bilayer herausgedrückt wird. Danach kann er zunächst in einem lose an die Membran adsorbierten Zustand verharren. Ist der pH-Wert unmittelbar an der Membran sehr viel größer als etwa 4,0, und somit die Affinität des adsorbierten Phalloporins zum Bilayer gering, so werden die Kanäle relativ schnell in die freie Wasserphase wegdiffundieren und sind unwiederbringlich verloren.

Ist der pH-Wert dagegen ausreichend niedrig ($\text{pH} \approx 4,0$), so bleiben die Kanäle an die Grenzfläche in einer Art "Wartezustand" adsorbiert und können sich wieder in den Bilayer einlagern, sobald die Feldstärke reduziert wird.

Ein einfaches Experiment hilft zu entscheiden, welcher dieser beiden Mechanismen zutreffen könnte. Bleiben die inaktivierten Kanäle, wie im ersten Fall gefordert, inkorporiert, so ist ihre Reaktivierung allein von dem herrschenden pH-Wert abhängig. Auch bei pH-Werten, bei denen sonst keine Recovery eintritt (z.B. bei pH 5,5), sollte die Membranleitfähigkeit ihren ursprünglichen Wert nach einem Zurückschalten auf eine nicht inaktivierende Spannung wiedererlangen, wenn man den pH-Wert nachträglich entsprechend erniedrigt (z.B. auf pH 4,0).

Die Wiederherstellung der Membranleitfähigkeit gelang in solchen Kontroll-experimenten jedoch nicht. Es ist daher wahrscheinlich, daß der Kanal bei niedrigen pH-Werten und hohen elektrischen Feldstärken wegen seines Nettoladungszustandes teilweise oder ganz aus der Membran heraustritt und je nach pH-Wert mit unterschiedlich großer Affinität an der Bilayer-Wasser-Grenzfläche adsorbiert bleibt.

Zu einer Inaktivierung kommt es nur bei Spannungen mit einem negativen Vorzeichen (Abb. 3.19). Daraus muß man folgern, daß der Kanalkomplex mit seiner zunehmenden positiven Nettoladung, die man bei einer Absenkung des pH-Wertes erwartet, nur zur cis-Seite der Membran herausgedrückt werden

kann. Daraus kann man ersehen, daß der Phalloporinkanal bezüglich der Membranseiten eine asymmetrische Struktur haben muß.

Die höhere Reaktionsgeschwindigkeit der Recoveryprozesse bei positiven (+50 mV) gegenüber negativen Membranspannungen (-50 mV) läßt darauf schließen, daß auch im adsorbierten Zustand noch ein Teil des Proteins (das binding site?) in den Bilayer hineinragt, damit das elektrische Feld wahrgenommen werden kann.

In Kap. 4.3 wurde der spontane Einbau von Phalloporin in Lipidbilayer erörtert und in diesem Zusammenhang ein dreistufiges Reaktionsschema für die Inkorporation vorgeschlagen und diskutiert. Dieses Schema (Gl. 6.1) berücksichtigt einen adsorbierten Zustand des Phalloporins an der Wasser-Membran-Grenzfläche, unmittelbar vor seiner Einlagerung in den Bilayer. Es ist naheliegend, daß die adsorbierten Zustände vor dem spontanen Einbau und vor der Recovery identisch sind.

4.6.3 Rubescensporin

Das Herstellen von Lipidmembranen mit einer definierten, zeitlich konstanten Anzahl von Rubescensporinkanälen gestaltet sich im Vergleich zum Phalloporin schwieriger. Auch durch die Entfernung des Kanalbildners aus der Wasserphase durch eine Perfusion wird bei einer gegebenen, stark negativen Membranspannung keine zeitlich konstante Membranleitfähigkeit erreicht, da die in der Membran vorhandenen Untereinheiten fortlaufend Aggregate mit variabler Größe bilden. Auf der anderen Seite führen hohe positive Membranspannungen zu der Zerstörung bereits gebildeter leitender Strukturen.

Die Aufnahme einer g-V-Kennlinie im stationären Zustand wie beim Phalloporin ist wegen der langsamen Aggregations- und Dissoziationsprozesse somit nicht möglich. Daher wurde die Membranspannung, von einer Referenzspannung (-100 mV) ausgehend, sprunghaft auf andere Werte geändert, nachdem die Membranleitfähigkeit jeweils eine bestimmte Höhe erreicht hatte. Auf eine Perfusion wurde dabei verzichtet, da die eintretenden Änderungen der Membranleitfähigkeiten im Vergleich zu dem Einbauvorgang sehr schnell sind.

Die Verhältnisse der Leitwerte vor und nach dem Spannungssprung ergeben eine sog. reduzierte Strom-Spannungs-Kennlinie für rubescensporinhaltige Membranen (Abb. 3.38). Es ist deutlich zu erkennen, daß die Inaktivierung von Rubescensporinkanälen bei positiven Spannungen der Lipidmembran eine

ausgeprägte Gleichrichtereigenschaft verleiht. Ionenströme vermögen die Membran nur bei negativen Spannungen zu passieren, bei Spannungen von $V > +30$ mV wird der Widerstand dagegen zunehmend größer. Rubescensporindotierte Lipidmembranen haben eine Gleichrichtungspolarität, die der phalloporinhaltigen Membranen entgegengesetzt ist (Abb. 3.15 und Abb. 3.38). Die Leitfähigkeit der Lipidmembran ist bei der vorgegebenen Rubescensporinkonzentration im negativen Spannungsbereich sehr hoch (Abb. 3.39), wird jedoch in positiver Spannungsrichtung reduziert und strebt bei Spannungen von $V > +50$ mV praktisch gegen die Leitfähigkeit des reinen, undotierten Bilayers. Im Gegensatz zum Phalloporin konnte für die Leitfähigkeit rubescensporindotierter Membranen in Abhängigkeit von der Membranspannung in dem untersuchten Bereich kein Sättigungsverhalten festgestellt werden (Abb. 3.39). Daher war eine detaillierte Auswertung nach der Art, wie sie in Kap. 4.6.1 für das Phalloporin mit den normierten Leitfähigkeitskurven durchgeführt wurde, nicht möglich. Beim Phalloporin ließ sich auf diese Weise die gute Korrelation zwischen dem Einzel- und dem Vielkanalverhalten in Abhängigkeit von dem pH-Wert und der Membranspannung aufzeigen.

Für das Rubescensporin fehlt dagegen eine genauere quantitative Beschreibung der pH- und der Spannungsabhängigkeit im Vielkanalsystem sowie Angaben über die bei der Kanalbildung wirkenden elektrostatischen Vorgänge in den kanalbildenden Aggregaten, etwa Aussagen zu der Größe der Schaltladung. Eine Korrelation des Viel- und des Einzelkanalverhaltens des Rubescensporins gestaltet sich im Vergleich zum Phalloporin schwieriger, weil man berücksichtigen muß, daß das Vielkanalsystem nicht allein die spannungsabhängige Einzelkanalkinetik reflektiert - wie es beim Phalloporin der Fall ist - , sondern außerdem die spannungsabhängige Bildung der leitfähigen Aggregate.

Eine kinetische Analyse des Rubescensporin-Einzelkanalverhaltens müßte nicht nur die Lebensdauern und Aufenthaltswahrscheinlichkeiten der einzelnen Leitwertniveaus umfassen, sondern auch die spannungsabhängige Verteilung der einzelnen Leitwertniveaus. So konnte für das Alamethicin, ein dem Rubescensporin wegen seines ähnlichen Kanalbildungsmechanismus vergleichbarer Kanalbildner, gezeigt werden, daß die Wahrscheinlichkeit, höhere Leitwertstufen anzunehmen, mit zunehmender Membranspannung steigt (Boheim, 1974).

Eine qualitative Betrachtung zeigt, daß beim Rubescensporin in ähnlicher Weise die Aufenthaltswahrscheinlichkeit in den höheren Leitwertstufen bei

höher negativen Membranspannungen deutlich größer wird. Insgesamt stellt sich eine genaue Analyse des Vielkanalverhaltens wegen der Vielfalt der zu beachtenden Einzelkanalparameter wie pH-Wert, Membranspannung, Konzentration des Kanalbildners und das Annehmen mehrerer Leitwertniveaus sehr viel schwieriger dar als beim Phalloporin.

4.7 Ionenpermeabilitäten

4.7.1 Phalloporin

Der Phalloporinkanal zeigt eine hohe Selektivität für monovalente Kationen gegenüber Chlorid als Anion mit einem Permeabilitätsverhältnis von $P_{Na} : P_{Cl} = 62$. Zwischen verschiedenen Alkalikationen ist die Unterscheidung dagegen nur schwach. Das mit dem Umkehrpotential bestimmte Permeabilitätsverhältnis $P_{Na} : P_{Li}$ beträgt nur 1.4, was nur frühere Untersuchungen zur Selektivität für K^+ , Cs^+ , Na^+ und Li^+ -Ionen bestätigt (Wilmsen, 1983). Damals wurde das Selektivitätsverhältnis aufgrund der unterschiedlichen Einzelkanalleitwerte in den verschiedenen Salzen abgeschätzt. Das dabei bestimmte Verhältnis von 2.1 der Einzelkanalleitwerte in $NaCl$ - und $LiCl$ -Lösungen bestätigt die geringe Diskriminierung des Kanals zwischen monovalenten Kationen.

Viele wasserlösliche Kanalbildner sind nur schwach selektiv für kleine Ionen. Dies gilt für die Colicine einschließlich ihres kanalbildenden C-terminalen Fragments (Schein et al., 1978; Davidson et al., 1984 a), für das Diphtherie-Toxin und das Tetanus-Toxin einschließlich ihrer Fragmente (Kagan et al., 1981; Boquet und Duflot, 1982), für das Seeanemonen-Toxin (Michaels, 1979; Varanda und Finkelstein, 1980) und schließlich die Porine (Benz, 1984). Trotz der schwachen Ionenselektivität weisen diese Kanalbildner sehr unterschiedliche Einzelkanalleitwerte auf, die auf ihre unterschiedlichen Lumendurchmesser zurückgeführt werden.

Auch zweiwertige Kationen vermögen den Phalloporinkanal noch besser zu passieren als Chloridionen. Wie im Falle der Alkalikationen unterscheidet der Phalloporinkanal nicht sehr stark zwischen Mg^{++} , Ca^{++} und Ba^{++} -Ionen. Die relativ zur Na^+ -Permeabilität errechnete Permeabilität für Mg^{++} -Ionen ist nur etwa doppelt so groß wie die für Ba^{++} -Ionen, wobei sich die Reihe $Mg^{++} > Ca^{++} > Ba^{++}$ ergibt.

Hinsichtlich der Ionenselektivitäten verhält sich der nikotinerge Acetyl-

cholinrezeptorkanal (nAChR) sehr ähnlich wie das Phalloporin. Auch er ist selektiv permeabel für Kationen und impermeabel für Anionen (Popot et al., 1976). Zweiwertige Kationen können den Kanal ebenfalls permeieren. Die Diskriminierung zwischen monovalenten Alkalikationen ist gering, und die Permeabilitäten der zweiwertigen Kationen ergeben die Selektivitätsreihe $Mg^{++} > Ca^{++} > Ba^{++} > Sr^{++}$ (Adams et al., 1980).

Der Einzelkanalleitwert Λ des Phalloporins ist direkt proportional zur spezifischen Leitfähigkeit σ der freien Elektrolytlösung. Eine nichtlineare Abhängigkeit des Leitwertes von der spezifischen Leitfähigkeit des Elektrolyten dagegen gilt gemeinhin als Hinweis auf Ion-Ion-Wechselwirkungen innerhalb des Kanals oder auf die Existenz regulatorischer Bindungsstellen für das permeierende Ion (Läuger, 1983). Ein solches Verhalten findet man beim Na^+ -Kanal, dessen Leitwert bei hohen Na^+ -Aktivitäten einen Sättigungswert annimmt (Moczydlowski et al., 1984), oder bei weniger selektiven Kationenkanälen, die nur von einem Kation gleichzeitig durchquert werden können (Coronado et al., 1980).

Dies ist beim Phalloporin nicht der Fall. Ein Sättigungsverhalten zeigt sich auch nicht bei hohen Ionenaktivitäten. Die weitgehende Linearität zwischen Λ und σ läßt den Schluß zu, daß das Kanallinnere vollständig mit wäßriger Elektrolytlösung gefüllt ist. Dies erscheint überraschend, da eine hohe Selektivität zwischen monovalenten Kationen und Chlorid gefunden wurde. Als Erklärung bietet sich an, daß ein negativ geladener Vorfilter in unmittelbarer Nähe der Kanalmündung bereits außerhalb des Kanallumens eine Selektion zwischen Ionen vornimmt. Dadurch würden bevorzugt Kationen in den Kanal eintreten, die ihn frei passieren können.

Sind die strukturellen Daten eines Membrankanals, wie seine Länge, bekannt, so läßt sich mit Hilfe der experimentell ermittelten Beziehung zwischen dem Einzelkanalleitwert und der spezifischen Leitfähigkeit des Elektrolyten der Durchmesser des wassergefüllten Kanallumens berechnen. Für den Kanal des Staphylococcus- α -Toxins mit einer Länge von etwa 100 Å und einem Leitwert von etwa 1000 pS in 1 M NaCl erhält man auf diese Weise einen Wert von 11.4 Å (Tobkes et al., 1985; Menestrina, 1986).

Dieser relativ große Wert gilt für das Hexameraggregat und ist mit der Tatsache vereinbar, daß das α -Toxin auch für größere hydratisierte Moleküle, wie Glucose, noch permeabel ist.

Strukturelle Daten für den Phalloporinkanal, wie seine Länge, fehlen bislang; jedoch muß man seinen Durchmesser eher geringer als den des α -

Toxins einschätzen, da sein Einzelkanalleitwert deutlich geringer ausfällt (40-62 pS in 1 M NaCl).

In diesem Punkt zeigt der Phalloporinkanale jedoch eine stärkere Ähnlichkeit mit dem Acetylcholinrezeptorkanal, dessen Lumen, anders als beim α -Toxin, nur durch fünf radial angeordnete α -helikale Untereinheiten gebildet wird. In 1-M-KCl-Lösungen und in Gegenwart millimolarer Konzentrationen von Ca^{++} beträgt der Einzelkanalleitwert des Phalloporins 75 pS und der des Rezeptors 79 pS (Boheim et al., 1981). Für den nAChR-Kanal wird ein minimaler Durchmesser von 6.4 Å angegeben (Huang et al., 1978; Dwyer et al., 1980), und er verhält sich ebenfalls wie eine wassergefüllte Pore (Lewis und Stevens, 1983), durch die alle Kationen mit einem Molekulargewicht kleiner als 135 D im teilweise hydratisierten Zustand permeieren können.

Als untere Grenze für transmembranäre Kanalproteine kann der Durchmesser der Gramicidinpore angesehen werden, der etwa 4 Å beträgt (Urry, 1971). Im Gegensatz zum α -Toxin und zum Acetylcholinrezeptor wird der Gramicidin-Kanal nicht durch mehrere, radial angeordnete α -Helices gebildet, sondern er verläuft im Inneren zweier Kopf an Kopf dimerisierter β -Helices, die abwechselnd aus D- und L-Aminosäuren aufgebaut sind (Urry, 1971).

Dieser Vergleich mit verschiedenen Kanälen zeigt, daß der Phalloporinkanale sicherlich eine kleinere Struktur umfaßt als das α -Toxin (Hexamer) und wahrscheinlich dem Acetylcholinrezeptor (Pentamer) vergleichbar ist.

4.7.2 Rubescensporin

Untersuchungen der Ionenselektivität des Rubescensporinkanals mit Hilfe der Einzelkanalströme gestalten sich sehr viel schwieriger als beim Phalloporin, da der Kanalbildung ein Aggregationsprozeß zugrunde liegt, der durch eine Reihe von Parametern, wie pH-Wert, Membranspannung und Konzentration des Kanalbildners gesteuert wird. Die Aufnahme von Strom-Spannungskennlinien unter asymmetrischen ionalen Bedingungen ist daher nur in einem sehr begrenzten Umfang möglich, und man kann Umkehrpotentiale im allgemeinen auf diese Weise nicht bestimmen.

In Kap. 4.5.2 wurde jedoch bereits erörtert, daß die pH-Abhängigkeit der Einzelkanalleitwerte einen Hinweis auf die Ionenselektivität des Rubescensporins gibt. Nimmt man als plausible Erklärung für die Zunahme der Leitwerte in Richtung zu alkalischen pH-Werten eine Zunahme an negativen

Festladungen im Bereich der Kanalmündung an, die dort zu einer Anreicherung von Gegenionen führen (Gouy-Chapman-Effekt), so kann man auf eine Kationen-selektivität des Rubescensporinkanals schließen (hier: Na^+ gegenüber Cl^-). Allerdings lassen sich auf diese Weise keine genauen Permeabilitätsverhältnisse zwischen einzelnen Ionenspezies berechnen.

Alternativ kann man das Umkehrpotential bei asymmetrischen ionalen Bedingungen mit dem Vielkanal-Membranstrom ermitteln. Versuche dieser Art wurden für das Rubescensporin bisher jedoch noch nicht ausgeführt.

4.8 Cytolytische Aktivitäten

Als der Angriffspunkt der cytolytischen Aktivitäten von Phallolysin und Rubescenslysin wurde in beiden Fällen die Zellmembran erkannt (Seeger und Wachter, 1981; Bühring et al., 1983). Dies war der Anlaß, die leitfähigkeitserhöhende Wirkung von Proteinpräparationen, die die beiden Cytolysine jeweils in hoher Anreicherung enthielten, in künstlichen Lipidmembranen zu untersuchen. Mit Hilfe dieser Methode gelang es zu zeigen, daß beide Amanita-Arten wasserlösliche, kanalbildende Proteine enthalten.

Neuere Untersuchungen haben jedoch die Frage nach der Identität der cytolytischen und der kanalbildenden Proteine aufgeworfen (Kap. 1.3.3.3). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine differenzierende Nomenklatur verwendet. Diese geht von der Prämisse aus, daß die Hämolyse und die Kanalbildung in Lipidmembranen durch zwei unterschiedliche Proteine vermittelt werden.

4.8.1 Phallolysin und Phalloporin

In früheren Untersuchungen war die Identität des hämolytisch wirksamen und des kanalbildenden Proteins in Amanita phalloides vorausgesetzt worden (Wilmsen, 1983). Allein mit Hilfe der Spannungssprung-Einbaumethode bei neutralem pH (Kap. 3.1.1.1) war es zunächst nicht möglich, den Gehalt von Proteinpräparationen an kanalbildendem Protein genau zu bestimmen, da man lediglich den Einbau einzelner Kanäle induzieren kann.

Erst nachdem sich die Bedeutung des pH-Wertes für die Inkorporation des Kanalbildners in Lipidmembranen herausstellte und sich Versuchsbedingungen wählen ließen, die einen spontanen und sehr viel effektiveren Einbau zulassen, konnte man die kanalbildende Aktivität quantitativ genauer untersuchen. Der spontane Einbau bei niedrigen pH-Werten, der in Kap. 3.1.1.2

dargestellt wurde, bot nun die Grundlage für die Entwicklung eines Aktivitätstests, mit dem man den relativen Gehalt des Kanalbildners in verschiedenen Proteinpräparationen exakter bestimmen kann. Als relative Maßangabe für die kanalbildende Aktivität bei festgelegten Versuchsbedingungen kann man einen geeigneten, konzentrationsabhängigen Einbauparameter des Phalloporins wählen (Kap. 3.1.1.3).

In Abb. 1.9 sind die relativen hämolytischen und kanalbildenden Aktivitäten in verschiedenen Fraktionen eines S300-Sephacryl-Säuleneeluats des wasserlöslichen Proteinanteils aus *A. phalloides* gegenübergestellt. Als Maß für die Kanalaktivität empfiehlt sich die maximale Steigung $(\Delta N/\Delta t)_{\max}$, die mit guter Näherung proportional zu der Konzentration des Kanalbildners in der Wasserphase ist (Kap. 3.1.1.3.3). Als Standardwert dient in diesem Beispiel die kanalbildende und hämolytische Aktivität des Ammoniumsulfat-Proteinpräzipitats, die jeweils gleich Eins gesetzt wurden. Dabei zeigt sich, daß sich die maximalen kanalbildenden und die maximalen hämolytischen Aktivitäten auf unterschiedliche Proteinfractionen verteilen. Bei dem Hämolysin und dem Kanalbildner muß es sich demnach um zwei unterschiedliche Proteine handeln; beide werden entsprechend als *Phallolysin* und *Phalloporin* bezeichnet.

Die eigentliche physiologische Bedeutung, die das Phalloporinprotein unter In-vivo-Bedingungen für den Pilz hat, liegen zur Zeit noch völlig im dunkeln.

Außerdem fehlen genauere biochemische Daten für das Protein, wie seine molekulare Masse und seine Aminosäuresequenz.

Die Aufreinigung und die nähere biochemische Charakterisierung des Kanalbildners Phalloporin ist gegenwärtig das Thema einer gesonderten Dissertation in derselben Arbeitsgruppe (Helbig, in Vorbereitung).

4.8.2. Rubescenslysin und Rubescensporin

Trotz seiner Herkunft aus einem Pilz der gleichen Gattung und einiger biochemischer Gemeinsamkeiten, wie die ähnliche molekulare Masse (35000 D; Seeger, 1980 b), wurde für das Rubescenslysin ein anderer Hämolysemechanismus gefordert als für das Phallolysin. Während man für das letztere einen kanalartigen Mechanismus annimmt, der zu einer Erhöhung der Kationenpermeabilität der Zellmembran führt (Seitz et al., 1981), übt das Rubescenslysin eine detergensartige Wirkung auf Lipidmembranen aus (Seeger,

1980 a). Diese äußert sich in wäßrigen Lösungen durch seine hohe Oberflächenaktivität und seine Neigung, Aggregate variabler Größe zu bilden.

Für *Amanita phalloides* gilt es mittlerweile als gesichert, daß die hämolytische und die kanalbildende Wirkung in künstlichen Lipidmembranen entgegen früheren Annahmen durch zwei unterschiedliche Proteine vermittelt werden (s.o.). Entsprechende Untersuchungen für die wasserlöslichen Proteine aus *A. rubescens* stehen noch aus; eine Identität des hämolytischen und des kanalbildenden Proteins kann man daher zur Zeit weder als gesichert noch als widerlegt ansehen.

Vorläufig wurden deshalb in Analogie zu den *A.-phalloides*-Proteinen die Bezeichnungen *Rubescensolysin* und *Rubescensporin* verwendet (Kap. 1.3.3.3). Die Aufreinigung und Identifizierung des kanalbildenden Proteins aus *A. rubescens* ist ebenfalls das Thema der gesonderten Dissertation in derselben Arbeitsgruppe (Helbig, in Vorbereitung). Diese hat die genauere biochemische Charakterisierung des Rubescensporins zum Ziel.

Im folgenden werden einige Aspekte aufgeführt, die Parallelen zwischen der hier behandelten Kanalbildung und dem in der Literatur beschriebenen Hämolysemechanismus verdeutlichen.

1. Künstliche planare Lipidmembranen werden im Verlauf eines Experiments instabil und platzen, wenn in Gegenwart des Rubescensporins hohe Membranleitfähigkeiten erreicht werden. Der Kanalbildner übt bei seinem fortschreitenden Einbau eine zunehmend destabilisierende Wirkung auf die Lipidbilayerstruktur aus. Dieser Effekt steht im Übereinklang mit der detergensartigen Wirkung des cytolytisch aktiven Proteins.

Phalloperin dagegen destabilisiert die Lipidbilayerstruktur nicht; auch bei den höchsten bisher erreichten Membranleitfähigkeiten bleiben die künstlichen Lipidmembranen für die Dauer eines Experiments – unter Umständen über mehrere Stunden – intakt.

2. Die Wirkung des kanalbildenden Proteins (Rubescensporin) beruht auf seiner sequentiellen Monomeraggregation in der Membran (Kap. 6.4). Das hämolytische Protein (Rubescensolysin) neigt zumindest in wäßriger Lösung zu der Ausbildung von Aggregaten variabler Größe (Seeger, 1980 b).

3. Die Titrationskurven der verschiedenen Leitwertniveaus (Abb. 3.48) zeigen reale pK-Werte zwischen 4.8 und 5.3. Interpretiert man diese Punkte als die pH-Werte, bei denen die Ladungsverhältnisse im Bereich der Mündung des kationenselektiven Kanals nahezu ausgeglichen sind (Kap. 4.5.2), so

zeigt sich eine auffallende Übereinstimmung mit dem isoelektrischen Wert, der für das hämolytisch wirksame Protein angegeben wird. Dieser pI-Wert liegt bei 4.9 (Seeger, 1980 b).

4. Bei der durch Rubescenslysin induzierten Hämolyse stellt man noch vor der Destabilisierung der Zellmembran einen prälytischen Ausstrom von K^+ -Ionen aus der Zelle fest (Seeger, 1980 a). Dieser Effekt ist mit der Bildung von kationenselektiven Kanälen im Lipidbilayerbereich gut zu vereinbaren.

5. In Kap. 1.3.2 wurden einige cytolytisch wirksame Antibiotika erwähnt, bei denen ein Zusammenhang zwischen ihrer detergensartigen Wirkung und einer Kanalbildung in Lipidbilayern besteht. Dazu zählen das Seeanemonen-Toxin aus *Stoichactis helianthus* (Shin et al., 1979), das Polypeptidantibiotikum Alamethicin (Jung et al., 1981) und das Bienengift Melittin (Hanke et al., 1983). Für diese Klasse von Cytolysinen ist das Auftreten einer Vielzahl nicht ganzzahliger Leitwertstufen charakteristisch. Diese spiegeln die sich fortlaufend ändernden Oligomierzustände wider und treten typischerweise auch beim Rubescensporin auf.

Es sei hier aber ausdrücklich betont, daß solche Indizien nicht den endgültigen experimentellen Beweis einer Identität von Rubescenslysin und Rubescensporin darstellen. Genauere Aufschlüsse sind erst durch eine detaillierte biochemische Charakterisierung zu erwarten, die zur Zeit im Rahmen einer gesonderten Dissertation durchgeführt wird (s.o.).

An dieser Stelle muß eine Diskrepanz erwähnt werden, die sich bei der Korrelation der Rubescensporin- und Rubescenslysinwirkung ergibt. Die Kanalbildung des Rubescensporins in der Membran wird durch - auf die Zugabeseite bezogene - negative Membranspannungen beschleunigt, während sie durch positive Spannungen verlangsamt bzw. rückgängig gemacht wird. Da Zellmembranen im allgemeinen ein auf die Membranninnenseite bezogenes negatives Ruhepotential besitzen, und hier die Zugabeseite auf einem entsprechend positiven Potential liegt, müßte die "In-vivo-Kanalbildung" durch Rubescensporin in der Zellmembran gerade unter der ungünstigeren Spannungspolarität verlaufen.

Setzt man die Identität des hämolytisch wirksamen und des kanalbildenden Proteins als Hypothese voraus, so ließe sich die dennoch ablaufende, auf einer spannungsabhängigen Aggregation beruhende Hämolyse dadurch erklären, daß beim Rubescensporin eine sog. "Konzentrations-Spannungs-Korrelation" besteht. Diese besagt, daß die Lage der Leitwert-Spannungs-Kennlinien

rubescensporindotierter Membranen (Abb. 3.39) entlang der Spannungsachse von der Konzentration des Kanalbildners abhängt und bei niedrigeren Konzentrationen nach links (in die negative Spannungsrichtung), bei höheren Konzentrationen nach rechts (in die positive Spannungsrichtung) verschoben werden.

Demnach kann man bei höheren Rubescensporinkonzentrationen als der hier verwendeten ($0.86 \mu\text{g Protein/ml}$) auch bei höheren positiven Membranspannungen eine drastische Zunahme der Membranleitfähigkeit erzielen. Eine solche Konzentrations-Spannungs-Korrelation wurde beim Polypeptidantibiotikum Alamethicin gut untersucht (Boheim und Kolb, 1978) und auch beim Rubescensporin qualitativ beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Hinzu kommt, daß Erythrozyten mit ihrer relativ niedrigen Membranspannung zwischen $+8 \text{ mV}$ und $+14 \text{ mV}$ (Lassen und Sten-Knudsen, 1968; Jay und Burton, 1969; Vorzeichen bezogen auf die Zellaußenseite = Zugabeseite des Proteins) der Kanalbildung durch Rubescensporin nur einen geringen Widerstand entgegensetzen würden.

5. Zusammenfassung

1. Die Einbaurrate des Phalloporins in künstliche planare Lipidmembranen ist pH-abhängig. Bei pH-Werten, die größer als 6.5 sind, kommt es praktisch zu keinem spontanen Einbau. Eine Inkorporation weniger Phalloporinkanäle kann unter diesen Umständen jedoch durch Spannungssprünge geeigneter Polarität an der Lipidmembran erreicht werden.

Mit zunehmender Konzentration an H^+ -Ionen in der wäßrigen Phase nimmt auch die Rate des spontanen Einbaus von Phalloporin zu. Dieses Verhalten wurde mit Hilfe mehrerer Parameter quantitativ erfaßt. Die pH-Abhängigkeit des spontanen Einbaus läßt sich durch Titrationskurven nach der Henderson-Hasselbalch-Beziehung beschreiben. Diese quantitativen Untersuchungen zeigen, daß der spontane Einbau des Phalloporins in Lipidmembranen mit einer hydrophil-amphipathischen Umwandlung des Proteinmoleküls einhergeht, wobei es sehr wahrscheinlich zur Protonierung einer oder zweier Seitengruppen negativ geladener Aminosäuren kommt.

2. Untersuchungen der Konzentrationsabhängigkeit zeigen, daß Phalloporinkanäle einheitlich strukturierte Komplexe sind und nach ihrer Inkorporation in Lipidmembranen vollkommen unabhängig voneinander funktionieren.

3. Der spontane Einbau von Phalloporin in künstliche Lipidmembranen bei sauren pH-Werten ist um mehrere Größenordnungen stärker als der spannungsinduzierte Einbau bei neutralem pH. Dies bietet die Möglichkeit, mit Hilfe der Perfusionsmethode Lipidmembranen herzustellen, die nur einen einzigen, definierten Kanaltyp enthalten, der die makroskopische Membranleitfähigkeit bestimmt. Phalloporindotierte Membranen zeigen eine Gleichrichtereigenschaft, die man in guter Näherung mit der Spannungsabhängigkeit der Einzelkanalkinetik korrelieren kann.

4. Bei pH-Werten, die unterhalb von 6.0 liegen, werden Phalloporinkanäle durch hohe negative Spannungen vollständig inaktiviert. Dieses Verhalten läßt sich sowohl im Vielkanalsystem als auch bei einzelnen Kanälen demonstrieren. Wahrscheinlich führt der sich ändernde Gesamtladungszustand des Kanalkomplexes zu diesem Verhalten, wenn die H^+ -Ionenkonzentration in der wäßrigen Phase über einen Grenzwert hinaus erhöht wird. Einwirkende elek-

trostatische Kräfte bewirken dann den Ausbau der Kanäle aus der Lipidmembran.

Dieser Inaktivierungsprozeß ist bei pH 5.5 irreversibel, zu niedrigeren pH-Werten hin nimmt allerdings das Bestreben der Membranleitfähigkeit zu, sich nach einer vollständigen Inaktivierung wieder zur erholen (Recovery). Bei pH 4.0 kann die Ausgangsleitfähigkeit praktisch vollständig wiederhergestellt werden.

5. Die makroskopische Membranleitfähigkeit läßt sich gut mit dem 2-Zustands-Modell für das Phalloporin innerhalb der Bursts bei Einzelkanalfluktuationen beschreiben. Das Verhalten des Phalloporins ist dem biologischer Membrankanäle, wie des nAChR-Kanals oder des Ca^{++} -abhängigen K^{+} -Kanals, sehr ähnlich. Der Phalloporinkanal ist primär permeabel für monovalente Kationen, die Permeabilität für zweiwertige Kationen ist um einen Faktor von 4-9 geringer. Für Chlorid als Anion ist der Kanal praktisch impermeabel.

Die Selektivitätseigenschaften und die Einzelkanalleitwerte des Phalloporins sind denen des nAChR-Kanals sehr ähnlich. Der Phalloporinkanal ist eine wassergefüllte Pore mit einem Minimaldurchmesser von 5-6 Å.

6. *Amanita rubescens* enthält ebenfalls ein wasserlösliches Protein, das eine Erhöhung der Leitfähigkeit in künstlichen planaren Lipidmembranen hervorruft. Im Unterschied zum Phalloporin kann dieses Rubescensporin über den gesamten untersuchten pH-Bereich von 4-9 spontan die Leitfähigkeit von Lipidmembranen erhöhen. Diese spontane Wirkung wird durch negative Membranspannungen beschleunigt, durch positive Membranspannungen verlangsamt bzw. rückgängig gemacht.

7. Im neutralen bis basischen pH-Bereich verläuft der Anstieg der Membranleitfähigkeit nach Zugabe von Rubescensporin exponentiell mit der Zeit. Dies weist auf eine Kanalbildung durch eine Aggregation von Untereinheiten in der Membran hin. Im Unterschied zum Phalloporin stellen die leitfähigkeitserhöhenden Strukturen des Rubescensporins in der Membranfläche keine unabhängig voneinander operierenden Strukturen dar.

8. Rubescensporin verleiht Lipidmembranen eine ausgeprägte Gleichrichtereigenschaft. Diese zeigt die entgegengesetzte Polarität wie in

phalloporindotierten Lipidmembranen. Die Gleichrichterwirkung des Rubescensporins beruht nicht wie beim Phalloporin auf der spannungsabhängigen Verteilung der Intraburstzustände, sondern sie resultiert aus der spannungsabhängigen Aggregation der kanalbildenden Untereinheiten in der Membranfläche.

9. Die Einzelkanaleigenschaften von Rubescensporin unterscheiden sich von der des Phalloporins durch zwei wesentliche Merkmale: das Auftreten multipler Leitwertstufen und die ausgeprägt starke pH-Abhängigkeit der Leitwerte dieser Stufen.

Das Auftreten verschiedener Leitwertstufen innerhalb einzelner Bursts weist auf einen Kanalbildungsmechanismus durch Aggregation von Untereinheiten in der Membran hin. Dieser ist charakteristisch für eine Reihe anderer detergensartig wirkender Kanalbildner, wie das Alamethicin, dessen Kanalbildungsmechanismus durch das Barrel-stave-Modell beschrieben wird.

6. Anhang

6.1 Kinetik des Phalloporineinbaus

Die Abb. 3.4a stellt eine charakteristische Phalloporineinbaukurve dar. Ihr S-förmiger Verlauf mit dem Durchlaufen eines Punktes mit maximaler Steigung $(\Delta N/\Delta t)_{\max}$ läßt darauf schließen, daß die Bildung von Phalloporinkanälen keinen einfachen Übertritt von Molekülen von der Wasserphase in den Bilayer darstellt, sondern eine Konsekutivreaktion mit mindestens einem zwischengeschalteten Zustand ist. Ein solcher Zustand kann etwa eine Adsorption an der Wasser-Lipid-Grenzfläche sein, bevor es zur Bildung eines fluktuierenden Kanals kommt. Bezeichnet man die Konzentration des Kanalbildners in der Wasserphase als c_p mit der Einheit mol pro Volumeneinheit, seinen adsorbierten Zwischenzustand als N_{ad} und die Anzahl der fluktuierenden Kanäle als Funktion der Zeit mit $N_k(t)$, so läßt sich der Einbauvorgang des Phalloporins im einfachsten Fall durch das folgende dreistufige Reaktionsschema beschreiben:



$v_{1,2}$ und $\lambda_{1,2}$ kennzeichnen die Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktionen zwischen diesen drei Zuständen. Im Experiment ist nur die Anzahl $N_k(t)$ der fluktuierenden Kanäle in der Membran direkt meßbar.

Für die nähere Betrachtung kann man c_p als konstant ansehen, da freies Phalloporin in der Wasserphase im Überschuß vorhanden ist. Ferner kann man als Nebenbedingung einen Zeitpunkt $t = 0$ kurz nach der Applikation von Phalloporin festlegen, zu dem noch keine Kanäle im adsorbierten und fluktuierenden Zustand existieren:

$$c_p = \text{const.}; \quad t = 0: N_{ad} = 0 \text{ und } N_k(t) = 0$$

Für die Teilreaktionen v und λ lassen sich die Geschwindigkeitsgleichungen angeben:

$$\frac{dN_{ad}}{dt} = v_1 c_p - v_2 N_{ad} \quad (Gl. 6.2)$$

$$\frac{dN_k(t)}{dt} = \lambda_1 N_{ad} - \lambda_2 N_k(t) \quad (Gl. 6.3)$$

Man darf erwarten, daß sich das Gleichgewicht zwischen der freien Wasserphase und dem adsorbierten Zustand durch Diffusion rasch einstellt. Dann gilt mit Gl. 6.2:

$$\frac{dN_k}{dt} = \frac{v_1}{v_2} c_p - \lambda_2 N_k(t) \quad (\text{Gl. 6.4})$$

Setzt man Gl. 6.4 in Gl. 6.3 ein, so erhält man:

$$\frac{dN_k(t)}{dt} = \lambda_1 \frac{v_1}{v_2} c_p - \lambda_2 N_k(t) \quad (\text{Gl. 6.5})$$

Setzt man der Übersichtlichkeit halber

$$\lambda_1 \frac{v_1}{v_2} c_p = \mu \quad (\text{Gl. 6.6})$$

so lautet Gl. 6.5:

$$\frac{dN_k}{dt} = \mu - \lambda_2 N_k(t) \quad (\text{Gl. 6.7})$$

Zu Beginn der Reaktion vom adsorbierten Zwischenzustand N_{ad} zum fluktuierenden Kanal wird die zeitliche Änderung der fluktuierenden Kanäle allein durch den Parameter μ bestimmt. Man setzt dabei voraus, daß sich das Gleichgewicht zwischen der Wasserphase und dem adsorbierten Zustand bereits eingestellt hat und daß man die Rückreaktion $-\lambda_2 N_k(t)$ (den "Wiederausbau" bereits fluktuierender Kanäle) vernachlässigen kann, da $N_k(t)$ noch klein gegen N_{ad} ist. Zu Beginn der Reaktion ist also nach Gl. 6.7 der Zuwachs an Kanälen maximal, und es gilt dann:

$$\frac{dN_k(t)}{dt} = \mu = \left(\frac{\Delta N}{\Delta t} \right)_{\max} \quad (\text{Gl. 6.8})$$

μ ist direkt als die maximale Steigung einer Phalloporineinbaukurve meßbar (s. Abb. 3.4a).

Die Lösung der Differentialgleichung (Gl. 6.3) lautet (mit den Nebenbedingungen $t = 0$: $N_{ad} = 0$; $N_k(0) = 0$):

$$\frac{N_{\infty} - N_k(t)}{N_{\infty}} = B \cdot e^{-\lambda_2 t} - A \cdot e^{-\lambda_1 t} \quad (\text{Gl. 6.9})$$

Dabei sind A und B Konstanten. N_{∞} ist die Anzahl von fluktuierenden Kanä-

len, die sich lange nach Beginn der Einbaureaktion eingestellt hat. Beschreibt dieses sequentielle dreistufige Reaktionsschema den Einbauprozess hinreichend gut, so muß sich der zeitliche Verlauf des Phalloporineinbaus als die Summe zweier Exponentialfunktionen darstellen lassen. In einer halblogarithmischen Darstellung können beide Funktionen getrennt dargestellt werden (Abb. 3.4b). Man erhält zwei Geraden, deren Steigungen durch $-\lambda_2$ und $-\lambda_1$ gegeben sind und die man getrennt bestimmen kann (Abb. 3.4b). Interessant ist, welche Folgerungen sich für die Konzentrationsabhängigkeiten der Größen μ , λ_1 , λ_2 und N_∞ aus diesem einfachen Reaktionsschema ergeben. Zu einem Zeitpunkt, der weit entfernt vom Beginn der Einbaureaktion ist, soll sich ein Gleichgewichtszustand zwischen adsorbierten und fluktuierenden Kanälen einstellen. Dann gilt nach Gl. 6.7 mit $N_k(t) = N_\infty$:

$$N_\infty = \frac{\mu}{\lambda_2} \quad (\text{Gl. 6.10})$$

In der Regel kann man die Größe N_∞ in Experimenten mit Phalloporin nicht exakt bestimmen. Näherungsweise läßt sich aber N_∞ durch die Anzahl an Kanälen angeben, die zu einem Zeitpunkt weit entfernt vom Beginn des Einbauprozesses erreicht wird. Vereinbarungsgemäß wurde hierzu die Größe N_{45} gewählt, die die Kanalanzahl zum Zeitpunkt $t - t_{1ag} = 45$ min angibt. Die Parameter N_{45} , μ und λ_2 müssen als Funktionen der Phalloporinkonzentration nach Gl. 6.10 somit näherungsweise die Bedingung

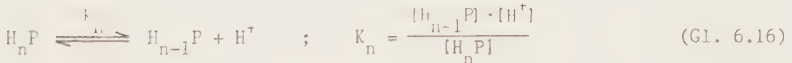
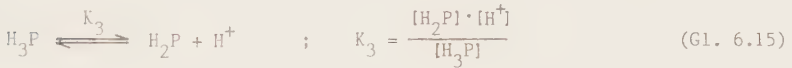
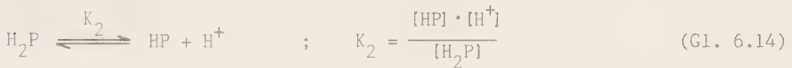
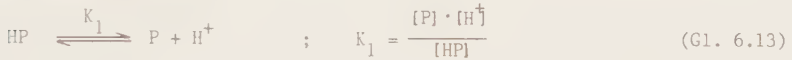
$$N_{45}(c_p) = \frac{\mu(c_p)}{\lambda_2(c_p)} \quad (\text{Gl. 6.11})$$

erfüllen. Ferner besagt Gl. 6.6, daß μ direkt proportional zu c_p sein muß:

$$\left(\frac{\Delta N}{\Delta t} \right)_{\max} = \mu \sim c_p \quad (\text{Gl. 6.12})$$

6.2 Die Henderson-Hasselbalch-Beziehung

Die Darstellung einer Titrationskurve gemäß der Henderson-Hasselbalch-Gleichung erlaubt eine Bestimmung der Anzahl der an einer Protonierungsreaktion beteiligten Protonen und Gruppen an einem Molekül. Hat ein Molekül P, z.B. das Phalloporin, n protonierbare Gruppen, so lauten die einzelnen Reaktionsgleichungen:



Dabei sind $K_1, K_2, \dots, K_n$ die Gleichgewichtskonstanten der einzelnen Protonierungsreaktionen. Die unterschiedlichen elektrischen Ladungen der Molekülzustände H_nP wurden dabei nicht berücksichtigt.

Voraussetzungen der Betrachtungen sind:

1. Die Protonierungsreaktionen nehmen sehr schnell die Gleichgewichtsverteilungen an.

2. Nur die Form H_nP kann den Ionenkanal ausbilden.

Zwischen den Gleichgewichtskonstanten gelten die Beziehungen:

$$K_1 = \frac{[\text{P}] \cdot [\text{H}^+]}{K_2 [\text{H}_2\text{P}]} \quad (\text{Gl. 6.17})$$

$$K_1 \cdot K_2 = \frac{[\text{P}] \cdot [\text{H}^+]^2}{\text{H}_2\text{P}} = [\text{P}] \cdot [\text{H}^+] \cdot \frac{[\text{H}^+]^2}{K_3 [\text{H}_3\text{P}]} \quad (\text{Gl. 6.18})$$

$$K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 = \frac{[P] \cdot [H^+]^3}{[H_3P]} = [P] \cdot [H^+] \frac{[H^+]^3}{K_4 [H_4P]} \quad (Gl. 6.19)$$

In allgemeiner Form:

$$\prod_{i=1}^n K_i = \frac{[P]}{[H_nP]} [H^+]^n \quad (Gl. 6.20)$$

In logarithmierter Form lautet Gl. 6.20:

$$\lg \prod_{i=1}^n K_i = \lg \frac{[P]}{[H_nP]} + n \cdot \lg [H^+] \quad (Gl. 6.21)$$

$$\lg \prod_{i=1}^n K_i = \lg \frac{[P]}{[H_nP]} - n \cdot pH \quad (Gl. 6.22)$$

$$\lg \frac{[P]}{[H_nP]} = n \cdot pH + \lg \prod_{i=1}^n K_i \quad (Gl. 6.23)$$

Dies ist die allgemeine Form der Henderson-Hasselbalch-Gleichung für ein Molekül mit n protonierbaren Gruppen. Besteht der Phalloporinkanal aus n Untereinheiten, die jeweils eine protonierbare Gruppe besitzen, so sind entsprechend n Protonen an der Protonierungsreaktion beteiligt. In diesem Fall erwartet man nach Gl. 6.23 bei der Auftragung von $\lg [P]/[H_nP]$ gegen den pH-Wert eine Gerade, deren Steigung n beträgt.

Im einfachsten Fall reagiert nur ein Proton mit dem Phalloporinmolekül (n = 1). Die Gl. 6.23 nimmt dann die Form

$$\lg \frac{[P^-]}{[HP]} = pH - pK \quad (Gl. 6.24)$$

an. Gl. 6.24 stellt die Henderson-Hasselbalch-Gleichung in der üblichen Form für eine Substanz mit einer protonierbaren Gruppe dar. Dabei ist pK der pK-Wert der protonierten Gruppe am Kanal, und man erwartet eine Geradensteigung von 1. Das Minuszeichen soll dabei andeuten, daß der unprotonierte Kanal P⁻ netto eine negative Ladung mehr besitzt als die protonierte Form HP. Über den tatsächlichen Ladungszustand gibt die Auftragung nach der Henderson-Hasselbalch-Beziehung keinen Aufschluß.

6.3 Ionenpermeabilitäten zweiwertiger Ionen

Die Nernst-Planck-Gleichung gibt im stationären Zustand die Flußdichte Φ_v einer Ionensorte v (Wertigkeit z_v) durch eine Membran bzw. durch Membrankanäle an:

$$\Phi_v = -D_v \left[\frac{c_v}{dx} + z_v c_v \frac{1}{RT} \frac{d\Phi}{dx} \right] \quad (\text{Gl. 6.25})$$

- $c_v(x)$ = Konzentration der Ionensorte v in der Membran am Orte x
 D_v = Diffusionskoeffizient der Ionensorte v in der Membran
 $\Phi(x)$ = elektrisches Potential in der Membran am Orte x

Mit einer Reihe von einschränkenden Annahmen, die aber für Diffusionsprozesse von Ionen an Lipidmembranen hinreichend gut erfüllt sind, nimmt die Nernst-Planck-Gleichung folgende Form an (nach Adam et al., 1977):

$$\Phi_v = P_v z_v u \frac{c_v' e^{z_v u} - c_v''}{e^{z_v u} - 1} \quad (\text{Gl. 6.26})$$

- P_v = Permeabilitätskoeffizient der Ionensorte v bei verschwindender Spannung
 c_v = Aktivitäten der Ionensorte v im cis- (c') und trans- (c'') Kompartiment
 u = FE_{rev}/RT

Fließt wie im Falle der Umkehrspannung E_{rev} kein Nettostrom durch den Kanal, so gilt für den Einzelkanalstrom I :

$$I = F \sum_v z_v \Phi_v = 0 \quad (\text{Gl. 6.27})$$

Angewendet auf Elektrolytlösungen, in denen als einzige permeable Ionen Na^+ , Cl^- und ein zweiwertiges Erdalkalikation (z.B. Ca^{++}) vorkommen, lautet Gl. 6.27:

$$2\Phi_{\text{Ca}} + \Phi_{\text{Na}} - \Phi_{\text{Cl}} = 0 \quad (\text{Gl. 6.28})$$

Einsetzen von Gl. 6.26 liefert:

$$4P_{Ca} u \frac{c'_{Ca} e^{2u} - c''_{Ca}}{e^{2u} - 1} + P_{Na} u \frac{c'_{Na} e^u - c''_{Na}}{e^u - 1} + P_{Cl} u \frac{c'_{Cl} e^{-u} - c''_{Cl}}{e^{-u} - 1} = 0 \quad (G1. 6.29)$$

Weitere Umrechnung liefert die Gleichung:

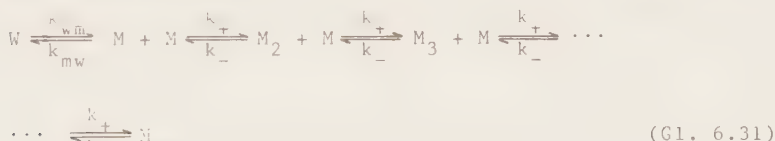
$$\frac{4P_{Ca}}{P_{Cl}} (c'_{Ca} e^{2u} - c''_{Ca}) + \frac{P_{Na}}{P_{Cl}} [c'_{Na} e^{2u} + e^u (c'_{Na} - c''_{Na}) - c''_{Na}] + c''_{Cl} e^{2u} - e^u (c'_{Cl} - c''_{Cl}) - c'_{Cl} = 0 \quad (G1. 6.30)$$

in der als einzig unbekannte Größe der Faktor P_{Ca}/P_{Cl} vorkommt, wenn das Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl} vorher unabhängig bestimmt wurde (Kap. 3.1.4.1).

6.4 Aggregationsmechanismus von Rubescensporin in planaren Lipidmembranen

Die Rubescensporinkonzentration (mol pro Volumeneinheit) in der wäßrigen Phase eines Lipidbilayersystems betrage W . Rubescensporinmonomere können sich aus der wäßrigen Phase gemäß ihrem Verteilungskoeffizienten in den Lipidbilayer einlagern. Nach einiger Zeit hat sich ein stationärer Zustand mit einer bestimmten Dichte M (mol pro Flächeneinheit) in der Bilayerfläche eingestellt. Rubescensporinmonomere können nun zu Dimeren aggregieren und durch Aufnahme weiterer Monomere fortlaufend Oligomere immer höherer Ordnung ausbilden.

Diesen Prozeß kann man in der Form einer einfachen kinetischen Reaktionsgleichung darstellen:



Dabei sind $M_2, M_3, \dots, M_n$ Rubescensporinoligomere, die jeweils nur durch Aufnahme eines Monomers M fortlaufend wachsen sollen. k_{wm} und k_{mw} sind die Geschwindigkeitskonstanten für die Verteilung der Moleküle zwischen der Wasser- und der Membranphase, k_+ und k_- kennzeichnen die Geschwindigkeitskonstanten für die Hin- und Rückreaktion jedes einzelnen Aggregationsschrittes. Ihre jeweiligen genauen Werte sind experimentell nur schwer unabhängig voneinander zu bestimmen, und man nimmt sie der Einfachheit halber für jeden Schritt als gleich an.

Im stationären Zustand läßt sich das Verteilungsgleichgewicht zwischen der Konzentration an Rubescensporin in der wäßrigen Phase und der Monomerdichte in der Membran durch eine Gleichgewichtskonstante K beschreiben:

$$\frac{M}{W} = K = \frac{k_{wm}}{k_{mw}} \quad ; \quad M = KW \tag{Gl. 6.32}$$

Setzt man außerdem voraus, daß die Geschwindigkeiten der Rückreaktionen k_{M_v} ($v = 2, \dots, n$) in jedem Oligomerisationsschritt vernachlässigbar klein sind, kann man für die zeitliche Änderung der Dimerdichte M_2 die

Reaktionsgeschwindigkeit der Dimerbildung die folgende Gleichung angeben:

$$\frac{dM_2}{dt} = k_+ M \cdot M = k_+ K^2 W^2 \quad (G1. 6.33)$$

Eine Integration liefert die zeitabhängige Dichte an Dimeren in der Membran:

$$M_2 = k_+ K^2 W^2 t \quad (G1. 6.34)$$

Entsprechend erhält man für die Bildungsrate an Trimeren mit Gl. 6.34:

$$\frac{dM_3}{dt} = k_+ M_2 \cdot M = k_+ K^3 W^3 t \quad (G1. 6.35)$$

und entsprechend die Trimerdichte

$$M_3 = k_+^2 K^3 W^3 \frac{t^2}{2!} \quad (G1. 6.36)$$

Analog läßt sich die Tetramerdichte berechnen:

$$M_4 = k_+^3 K^4 W^4 \frac{t^3}{2 \cdot 3} = k_+^3 K^4 W^4 \frac{t^3}{3!} \quad (G1. 6.37)$$

Die Dichte an Oligomeren n-ten Grades in der Membranfläche ist dann:

$$M_n = k_+^{n-1} K^n W^n \frac{t^{n-1}}{(n-1)!} = \frac{(k_+ K W t)^{n-1}}{(n-1)!} K W \quad (G1. 6.38)$$

Führt man für $n - 1 = v$ ein, so erhält man:

$$M_{v+1} = \frac{(k_+ K W t)^v}{v!} K W \quad (G1. 6.39)$$

Nun ist der Gesamtstrom durch die Lipidmembran gegeben durch die Summe der Ströme durch alle einzelnen Oligomere. Für die Summe aller Oligomere erhält man mit Gl. 6.32 und 6.39:

$$\sum_{n=1}^{\infty} M_n = M + M_2 + M_3 + \dots$$

$$\begin{aligned}
 &= KW + \frac{k + Kw_t}{1!} KW + \frac{(k + Kw_t)^2}{2!} KW + \dots \\
 &= KW \left[1 + \frac{k + Kw_t}{1!} + \frac{(k + Kw_t)^2}{2!} + \dots \right] \\
 &= KW \sum_{v=0}^{\infty} \frac{(k + Kw_t)^v}{v!} \quad (\text{Gl. 6.40})
 \end{aligned}$$

Die Entwicklung von e^x in eine Taylorreihe lautet allgemein:

$$e^x = 1 + x + \frac{x^2}{2!} + \frac{x^3}{3!} + \dots = \sum_{v=0}^{\infty} \frac{x^v}{v!} \quad (\text{Gl. 6.41})$$

Ein Vergleich mit Gl. 6.40 zeigt, daß der Summenausdruck dort eine Exponentialfunktion darstellt. Setzt man $x = k + Kw_t$, so lautet Gl. 6.40 umgeformt:

$$\sum_{n=1}^{\infty} M_n = KW \sum_{v=0}^{\infty} \frac{x^v}{v!} = KW e^{k + Kw_t} \quad (\text{Gl. 6.42})$$

Die charakteristische Zeit τ für die Zunahme um den Faktor e ist durch

$$\tau = \frac{1}{k + Kw_t} \quad (\text{Gl. 6.43})$$

gegeben. Entsprechend diesem Schema ist die Zeitkonstante τ umgekehrt proportional zu der Konzentration W an Rubescensporin in der Wasserphase.

Eine weitere wichtige Folgerung aus diesem Schema ist, daß die Summe aller Rubescensporinoligomere bei einer gegebenen Konzentration W in der Wasserphase exponentiell mit der Zeit anwächst. Nimmt man alle Oligomerformen einschließlich des Monomers M als ionenleitende Strukturen mit vergleichbaren Leitwerten an, so muß auch der zeitliche Verlauf des Gesamtmembranstroms gemäß Gl. 6.42 einer exponentiellen Gesetzmäßigkeit folgen. Da es sich hier um eine grobe qualitative Abschätzung handelt, ist es nicht widersprüchlich, bereits für das Monomer M eine ionenleitende Struktur anzunehmen. Die in diesem Schema einfachste, sich in die Membran einbauende, Monomerform M könnte in Wirklichkeit bereits ein kleines "Elementaraggregat" sein, das als solches bereits, entsprechend dem Barrel-stave-Modell (Kap. 1.3.2), einen ionenleitenden Kanal aus mehreren Proteinmole-

külen bildet.

Schließlich sei der Unterschied dieses Kanalbildungsschemas für das Rubescensporin zum Kanalbildungsmechanismus des Phalloporins hervorgehoben. Das in diesem Abschnitt dargestellte Schema geht von einer Oligomerisation untereinander wechselwirkender Elemente in der Membranfläche aus. Daraus läßt sich ein mit der Zeit exponentiell verlaufender Gesamtmembranstrom ableiten (Gl. 6.42).

Im Gegensatz dazu stellen Phalloporinkanäle in der Membran voneinander unabhängig funktionierende, zeitlich konstante Komplexe dar, die untereinander keine Wechselwirkungen ausüben (Kap. 6.1). Ein starker Hinweis darauf ist u.a. die zeitliche Konstanz des Membranstroms durch phalloporindotierte Membranen nach einer Perfusion (Abb. 3.13).

7. Literaturverzeichnis

- Adam, G., Läuger, P. und Stark (1977).
Physikalische Chemie und Biophysik.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- Adams, D.J., Dwyer, T.M. und Hille, B. (1980).
The permeability of endplate channels to monovalent and
divalent metal cations.
J. Gen. Physiol. 75: 493-510.
- Aloof-Hirsch, S., De Vries, A. und Berger, A. (1968).
The direct lytic factor of cobra venom; purification and
chemical characterization.
Biochim. Biophys. Acta 154: 53-60.
- Apell, H.-J., Bamberg, E. und Läuger, P. (1979).
Effects of surface charge on the conductance of the gramicidin
channel.
Biochim. Biophys. Acta 552: 369-378.
- Austin, R. M., Beeson, K.W., Eisenstein, L., Frauenfelder, H. und Gunsalus, I.C. (1975).
Dynamics of ligand binding to myoglobin.
Biochemistry 14: 5355-5373.
- Bamberg, E. und Läuger, P. (1974).
Temperature-dependent properties of gramicidin A channels.
Biochim. Biophys. Acta 367: 127-133.
- Bamberg, E., Benz, R., Läuger, P. und Stark, G. (1974).
Ionentransport durch biologische Membranen.
Chemie in unserer Zeit 8: 33-43.
- Barrett, J.N., Magleby, K.L. und Palotta, B.S. (1982).
Properties of single calcium-activated potassium channels in
cultured rat muscle.
J. Physiol. (Lond.) 331: 211-230.
- Bean, R.C., Shepherd, W.C., Chan, H. und Eichner, J. (1969).
Discrete conductance fluctuations in lipid bilayer protein
membranes.
J. Gen. Physiol. 53: 741-757.
- Belmonte, G., Cescatti, L., Ferrari, B., Nicolussi, T., Ropele, M. und Menestrina, G. (1986).
Pore formation by Staphylococcus aureus alpha-toxin in lipid
bilayers. Dependence upon temperature and toxin concentration.
Eur. Biophys. J. 6: 349-358.

- Benz, R., Janko, K., Boos, W. und Läuger, P. (1978).
Formation of large, ion-permeable membrane channels by the
matrix protein (porin) of *Escherichia coli*.
Biochim. Biophys. Acta 54: 305-319.
- Benz, R. (1984).
Structure and selectivity of the porin channels. In: *Ion
Channels: Molecular and Physiological Aspects.*
Current Topics in Membranes and Transport, Vol. 21 (Stein,
W.D., ed.).
Academic Press, Orlando, pp. 199-219.
- Bernheimer, A.W. (1974).
Interaction between membranes and cytolytic bacterial toxins.
Biochim. Biophys. Acta 344: 27-50.
- Bergelson, L.D. (1980).
Lipid Biochemical Preparations.
Elsevier, Amsterdam.
- Betz, H. (1984).
Neues von der Nervenzellmembran.
Naturwissenschaften 71: 363-368.
- Betz, H. (1985).
Der Glycinrezeptor aus Rattenruckenmark: Untersuchungen zum
Wirkort des Pflanzenalkaloids Strychnin.
Angewandte Chemie 97: 363-368.
- Bhakdi, S. und Tranum-Jensen, J. (1978).
Molecular nature of the complement lesion.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 5655-5659.
- Bhakdi, S. und Tranum-Jensen, J. (1983).
Membrane damage by channel-forming proteins.
TIBS 8: 134-136.
- Bittel, H. und Storm, L. (1971).
Rauschen
Springer-Verlag, Berlin.
- Blewitt, M.G., Chung, L.A. und London, E. (1985).
Effect of pH on the conformation of diphtheria toxin and its
implications for membrane penetration.
Biochemistry 24: 5458-5464.
- Boheim, G. (1974).
Statistical analysis of alamethicin in black lipid membranes.
J. Membr. Biol. 19: 277-303.

- Boheim, G. und Kolb, H.-A. (1978).
Analysis of the multi-pore system of alamethicin in a lipid membrane. I. Voltage-jump current-relaxation measurements. *J. Membr. Biol.* 38: 99-105.
- Boheim, G., Hanke, W., Barrantes, F.J., Eibl, H., Sakmann, B., Fels, G. und Maelicke, A. (1981).
Agonist-activated ionic channels in acetylcholine receptor reconstituted into planar lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 3586-3590
- Boheim, G., Hanke, W. und Jung, G. (1983).
Alamethicin pore formation: voltage-dependent flip-flop of α -helix dipoles. *Biophys. Struct. Mech.* 9: 181-191.
- Boquet, P. und Duflot, E. (1982).
Tetanus toxin fragment forms channels in lipid vesicles at low pH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 7614-7618.
- Brisson, A. und Unwin, P.N.T. (1984).
Tubular crystals of acetylcholine receptor. *J. Cell. Biol.* 99: 1202-1211.
- Brunden, K.R., Uratani, Y. und Cramer, W.A. (1984).
Dependence of the conformation of a colicin E1 channel-forming peptide on acidic pH and solvent polarity. *J. Biol. Chem.* 259: 7682-7687.
- Bühning, H.J., Vaisius, A.C. und Faulstich, H. (1983).
Membrane damage of liposomes by the mushroom toxin phallolysin. *Biochim. Biophys. Acta* 733: 117-123.
- Bullock, J., Cohen, F., Dankert, J. und Cramer, W. (1983).
Comparison of the macroscopic and single channel conductance properties of colicin E1 and its COOH-terminal tryptic peptide. *J. Biol. Chem.* 258: 9908-9912.
- Claudio, T., Ballivet, M., Patrick, J. und Heinemann, S. (1983).
Nucleotide and deduced amino acid sequences of Torpedo californica acetylcholine receptor subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 1111-1115.
- Cleveland, B.M., Slatin, G., Finkelstein, A. und Levinthal, C. (1983).
Structure-function relationship for a voltage dependent ion channel: properties of COOH-terminal fragments of colicin E1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3706-3710.

- Eibl, H. (1980).
Synthesis of glycerophospholipids.
Chem. Phys. Lipids 26: 405-429.
- Eibl, H. (1984).
Phospholipide als Bausteine biologischer Membranen.
Angew. Chemie 96: 247-262.
- Eibl, H., McIntyre, J.O., Fleer, E.A.M. und Fleischer, S. (1983).
Synthesis of labeled phospholipids in high yield.
Methods Enzymol. 98: 623-632.
- Eisenberg, M., Hall, J.E. und Mead, C.A. (1973).
The nature of voltage-dependent conductance induced by
alamethicin in black lipid membranes.
J. Membr. Biol. 14: 143-176.
- Engel, A., Massalski, A., Schindler, H., Dorset, D.L. und Rosenbusch, J.P.
(1985).
Porin channel triplets merge into single outlets in
Escherichia coli outer membranes.
Nature 317: 643-645.
- Engelman, D.M. und Steitz, T.A. (1981).
The spontaneous insertion of proteins into and across
membranes: the helical hairpin hypothesis.
Cell 23: 411-422.
- Faulstich, H. und Weckauf-Bloching, M. (1974).
Isolation and toxicity of two cytolytic glycoproteins from
Amanita phalloides mushrooms.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355: 1489-1494.
- Faulstich, H., Zobeley, S. und Weckauf-Bloching, M. (1974).
Cytolytic properties of phallolysin.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355: 1495-1498.
- Faulstich, H. und Weckauf, M. (1975).
Cytolysis of red cells mediated by phallolysin, a toxin binding
to N-acetylglucosamine on the cell surface.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356: 1187-1189.
- Faulstich, H., Bühring, H.J. und Seitz, J. (1983).
Physical properties and function of phallolysin.
Biochemistry 12: 4574-4580.
- Fields, K.L. und Luria, S.E. (1969).
Effects of colicins E1 and K on cellular metabolism.
J. Bacteriol. 97: 64-77.

- Finer-Moore, J. und Stroud, R.M. (1984).
Amphipatic analysis and possible formation of the ion channel
in an acetylcholine receptor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 155-159.
- Finkelstein, A. und Holz, R. (1973).
Aqueous pores created in thin lipid membranes by the polyene
antibiotics nystatin and amphotericin B. In: Membranes, A
Series of Advances, Vol. 2 (Eisenman, G., ed.).
Marcel Dekker, New York, pp. 377-408.
- Frauenfelder, H., Petsko, G.A. und Tsernoglou, D. (1979).
Temperature-dependent X-ray diffraction as a probe of protein
structural dynamics.
Nature 280: 558-563.
- Gardos, G. (1958).
The function of calcium in the potassium permeability of human
erythrocytes.
Biochim. Biophys. Acta 30: 653-654.
- Gelfert-Peukert, S. (1986).
Einfluß des Austausches und der Modifikation einzelner
Aminosäuren des Eicosapeptids Alamethicin auf die Eigenschaften
des Ionenkanals. Dissertation.
Abteilung für Biologie, Ruhr-Universität Bochum.
- Goldman, D.E. (1943).
Potential, impedance and rectification in membranes.
J. Gen. Physiol. 27: 37-60.
- Gordon, L.G.M. und Haydon, D.A. (1972).
The unit conductance channel of alamethicin.
Biochim. Biophys. Acta 255: 1014-1018.
- Gordon, L.G.M. und Haydon, D.A. (1975).
Potential dependent conductances in lipid membranes containing
alamethicin.
Phil. Trans. R. Soc. London B. 270: 433-447.
- Gorter, E. und Grendel, F. (1925).
On the bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of
blood.
J. Exp. Med. 41: 439-443.
- Gould, J.M. und Cramer, W.A. (1977).
Studies on the depolarisation of the Escherichia coli cell
membrane by colicin El.
J. Biol. Chem. 252: 5491-5497.

- Eibl, H. (1980).
Synthesis of glycerophospholipids.
Chem. Phys. Lipids 26: 405-429.
- Eibl, H. (1984).
Phospholipide als Bausteine biologischer Membranen.
Angew. Chemie 96: 247-262.
- Eibl, H., McIntyre, J.O., Fleer, E.A.M. und Fleischer, S. (1983).
Synthesis of labeled phospholipids in high yield.
Methods Enzymol. 98: 623-632.
- Eisenberg, M., Hall, J.E. und Mead, C.A. (1973).
The nature of voltage-dependent conductance induced by alamethicin in black lipid membranes.
J. Membr. Biol. 14: 143-176.
- Engel, A., Massalski, A., Schindler, H., Dorset, D.L. und Rosenbusch, J.P. (1985).
Porin channel triplets merge into single outlets in Escherichia coli outer membranes.
Nature 317: 643-645.
- Engelman, D.M. und Steitz, T.A. (1981).
The spontaneous insertion of proteins into and across membranes: the helical hairpin hypothesis.
Cell 23: 411-422.
- Faulstich, H. und Weckauf-Bloching, M. (1974).
Isolation and toxicity of two cytolytic glycoproteins from Amanita phalloides mushrooms.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355: 1489-1494.
- Faulstich, H., Zobeley, S. und Weckauf-Bloching, M. (1974).
Cytolytic properties of phallolysin.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355: 1495-1498.
- Faulstich, H. und Weckauf, M. (1975).
Cytolysis of red cells mediated by phallolysin, a toxin binding to N-acetylglucosamine on the cell surface.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356: 1187-1189.
- Faulstich, H., Bühring, H.J. und Seitz, J. (1983).
Physical properties and function of phallolysin.
Biochemistry 12: 4574-4580.
- Fields, K.L. und Luria, S.E. (1969).
Effects of colicins E1 and K on cellular metabolism.
J. Bacteriol. 97: 64-77.

- Finer-Moore, J. und Stroud, R.M. (1984).
Amphipatic analysis and possible formation of the ion channel
in an acetylcholine receptor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 155-159.
- Finkelstein, A. und Holz, R. (1973).
Aqueous pores created in thin lipid membranes by the polyene
antibiotics nystatin and amphotericin B. In: Membranes, A
Series of Advances, Vol. 2 (Eisenman, G., ed.).
Marcel Dekker, New York, pp. 377-408.
- Frauenfelder, H., Petsko, G.A. und Tsernoglou, D. (1979).
Temperature-dependent X-ray diffraction as a probe of protein
structural dynamics.
Nature 280: 558-563.
- Gardos, G. (1958).
The function of calcium in the potassium permeability of human
erythrocytes.
Biochim. Biophys. Acta 30: 653-654.
- Gelfert-Peukert, S. (1986).
Einfluß des Austausches und der Modifikation einzelner
Aminosäuren des Eicosapeptids Alamethicin auf die Eigenschaften
des Ionenkanals. Dissertation.
Abteilung für Biologie, Ruhr-Universität Bochum.
- Goldman, D.E. (1943).
Potential, impedance and rectification in membranes.
J. Gen. Physiol. 27: 37-60.
- Gordon, L.G.M. und Haydon, D.A. (1972).
The unit conductance channel of alamethicin.
Biochim. Biophys. Acta 255: 1014-1018.
- Gordon, L.G.M. und Haydon, D.A. (1975).
Potential dependent conductances in lipid membranes containing
alamethicin.
Phil. Trans. R. Soc. London B. 270: 433-447.
- Gorter, E. und Grendel, F. (1925).
On the bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of
blood.
J. Exp. Med. 41: 439-443.
- Gould, J.M. und Cramer, W.A. (1977).
Studies on the depolarisation of the Escherichia coli cell
membrane by colicin E1.
J. Biol. Chem. 252: 5491-5497.

- Grygorczyk, R., Schwarz, W. und Passow, H. (1984).
Ca²⁺-activated K⁺ channels in human red cells.
Biophys. J. 45: 693-698.
- Guy, H.R. (1983).
A model of colicin E1 membrane channel protein structure.
Biophys. J. 41: 363a (abstr.).
- Guy, H.R. und Seetharamulu, P. (1986).
Molecular model of the action potential sodium channel.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 508-512.
- Habermann, E. (1960).
Zur Toxikologie und Pharmakologie des Gasbrandgiftes
(Clostridium welchii Typ A) und seiner Komponenten.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharmac. 238: 502-524.
- Habermann, E. (1968).
Biochemie, Pharmakologie und Toxikologie der Inhaltsstoffe von
Hymenopterengiften.
Ergebn. Physiol. 60: 220-325.
- Hamill, O.P. (1981).
Potassium channel currents in human red blood cells.
J. Physiol. (Lond.) 319: 97-98P.
- Hamill, O.P. und Sakmann, B. (1981).
Multiple conductance states of single acetylcholine receptor
channels in embryonic muscle cells.
Nature 294: 462-464.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. und Sigworth, F.J. (1981).
Improved patch-clamp techniques for high-resolution current
recording from cells and cell-free membrane patches.
Pflügers Arch. 391: 85-100.
- Hanke, W. und Boheim, G. (1980).
The lowest conductance state of the alamethicin pore.
Biochim. Biophys. Acta 596: 456-462.
- Hanke, W. (1981).
Analyse der Eigenschaften porenbildender Antibiotika und
Proteine in planaren Lipidmembranen im Bereich der Temperatur
der Lipidphasenumwandlung. Dissertation.
Abteilung für Biologie, Ruhr-Universität Bochum.

- Hanke, W., Eibl, H. und Boheim, G. (1981).
A new method for membrane reconstitution: fusion of protein containing vesicles with planar bilayer membranes below lipid phase transition temperature.
Biophys. Struct. Mech. 7: 131-137.
- Hanke, W. und Miller, C. (1983).
Single chloride channels from Torpedo electroplax: activation by protons.
J. Gen. Physiol. 82: 25-45.
- Hanke, W., Methfessel, C., Wilmsen, H.U., Katz, E., Jung, G. und Boheim, G. (1983).
Melittin and a chemically modified trichotoxin form alamethicin-type multistate pores.
Biochim. Biophys. Acta 727: 108-114.
- Hanke, W. (1984).
Reconstitution of channel proteins from Torpedo electroplax into virtually solvent-free lipid bilayers.
Biochem. Bioeng. 12: 341-351.
- Hanke, W. und Kaupp, U.B. (1984).
Incorporation of ion channels from bovine rod outer segments into planar lipid bilayers.
Biophys. J. 46: 587-595.
- Hanke, W., Methfessel, C., Wilmsen, H.U. und Boheim, G. (1984).
Ion channel reconstitution into lipid bilayer membranes on glass patch pipettes.
Bioelectrochemistry and Bioenergetics 12: 329-339.
- Harshman, S. (1979).
Action of staphylococcal α -toxin on membranes: some recent advances.
Mol. Cell. Biochem. 23: 142-152.
- Haydon, D.A. und Hladky, S.B. (1972).
Ion transport across thin lipid membranes: a critical discussion of mechanisms in selected systems.
Quat. Rev. Biophys. 5: 187-282.
- Helenius, A., Kartenbeck, J., Simons, K. und Fries, E. (1980).
On the entry of Semliki forest virus into BHK-21 cells.
J. Cell Biol. 84: 404-420.

- Henderson, R. und Unwin, P.N.T. (1975).
Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy.
Nature 257: 28-32.
- Hille, B. (1984).
Ionic channels of excitable membranes.
Sinauer Associates Inc., Sunderland.
- Hladky, S.B. und Haydon, D.A. (1970).
Discreteness of conductance change in bimolecular lipid membranes in the presence of certain antibiotics.
Nature 225: 451-453.
- Hoch, D.H., Romero-Mira, M., Ehrlich, B.E., Finkelstein, A., DasGupta, B.R. und Simpson, L.L. (1985).
Channels formed by botulinum, tetanus and diptheria toxins in planar lipid bilayers: relevance to translocation of proteins across membranes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 1692-1696.
- Hodgkin, A.L. und Huxley, A.F. (1952).
A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.
J. Physiol. 117: 500-544.
- Hol, W.G.J., Halie, L.M. und Sander, G. (1981).
Dipoles of the α -helix and β -sheet: their role in protein folding.
Nature 294: 532-536.
- Hol, W.G.J. (1985).
The role of α -helix dipole in protein function and structure.
Prog. Biophys. Molec. Biol. 45: 149-195.
- Huang, L.-Y., Catterall, W.A. und Ehrenstein, G. (1978).
Selectivity of cations and nonelectrolytes for acetylcholine-activated channels in cultured muscle cells.
J. Gen. Physiol. 71: 397-410.
- Huber, R., Deisenhofer, J., Colman, P.M., Matshushima, M. und Palm, W. (1976).
Crystallographic structure studies of an IgG molecule and an Fc fragment.
Nature 264: 415-420.

- Hucho, F. und Changeux, J.-P. (1973).
Molecular weight and quaternary structure of the cholinergic receptor protein extracted by detergents from *Electrophorus electricus* electric tissue.
FEBS Lett. 38: 11-15.
- Hucho, F. (1986).
The nicotinic acetylcholine receptor and its ion channel.
Eur. J. Biochem. 158: 211-226.
- Imoto, K., Methfessel, C., Sakmann, B., Mishina, M., Mori, Y., Konno, T., Fukuda, K., Kurasaki, M., Bujo, H., Fujita, Y. und Numa, S. (1986).
Location of a δ -subunit region determining ion transport through the acetylcholine receptor channel.
Nature 324: 670-674.
- Jay, A.W.L. und Burton, A.C. (1969).
Direct measurement of potential difference across the human red blood cell membrane.
Biophys. J. 9: 115-121.
- Jung, G., Brückner, H. und Schmitt, H. (1981).
Properties of the membrane modifying polypeptide antibiotics alamethicin and trichotoxin A-40. In: Structure and Activity of Natural Peptides (Voelter, W. and Weitzel, G., eds.). de Gruyter, Berlin, pp. 75-114.
- Kagan, B.L., Finkelstein, A. und Colombini, M. (1981).
Diphtheria toxin fragment forms large pores in phospholipid bilayer membranes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 4950-4954.
- Kameyama, M., Kiyosue, T. und Soejima, M. (1983).
Single channel analysis of the inward rectifier K current in the rabbit ventricular cells.
Jap. J. Physiol. 33: 1039-1056.
- Karplus, M. (1982).
Dynamics of proteins.
Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 86: 386-395.
- Katz, B. (1966).
Nerve, Muscle and Synapse.
Mc Graw-Hill, New York.

- Kistler, J., Stroud, R.M., Klymkovski, M.W., Lalancette, R.A. und Fairclough, R.H. (1982).
Structure and function of an acetylcholine receptor.
Biophys. J. 37: 371-383.
- Kolb, H.-A. und Boheim, G. (1978).
Analysis of the multi-pore system of alamethicin in a lipid membrane. II. Autocorrelation analysis and power spectral density.
J. Membr. Biol. 38: 151-191.
- Krueger, B.K., Worley, J.F. und French, R.J.
Single sodium channels from rat brain incorporated into planar lipid bilayer membranes.
Nature 303: 172-175.
- Kuffler, S. und Nicholls, J.G. (1976).
From Neuron to Brain.
Sinauer, New York.
- Kurachi, Y. (1985).
Voltage-dependent activation of the inward-rectifier potassium channel in the ventricular cell membrane of guinea-pig heart.
J. Physiol. 366: 365-385.
- Kyte, J. (1972).
Properties of the two polypeptides of sodium- and potassium-dependent adenosine triphosphatase.
J. Biol. Chem. 247: 7642-7649.
- Kyte, J. und Doolittle, R. (1982).
A simple method for displaying the hydropathic character of a protein.
J. Mol. Biol. 157: 105-132.
- Labarca, P., Coronado, R. und Miller, C. (1980).
Thermodynamic and kinetic studies of the gating behavior of a K⁺-selective channel from the sarcoplasmatic reticulum membrane.
J. Gen. Physiol. 76: 397-424.
- Lakowicz, J.R. und Weber, G. (1980).
Nanosecond segmental mobilities of tryptophan residues in proteins observed by lifetime-resolved fluorescence anisotropy.
Biophys. J. 32: 591-600.

- Lassen, R.V. und Sten-Knudsen, O. (1968).
Direct measurements of membrane potential and membrane resistance of human red cells.
J. Physiol. (Lond.) 195: 681-696.
- Latorre, R., Alvarez, O., Ehrenstein, G., Espinoza, M. und Keyes, J. (1975).
The nature of the voltage-dependent conductance of the hemocyanin channel.
J. Membr. Biol. 25: 163-182.
- Latorre, R., Vergara, C. und Hidalgo, C. (1982).
Reconstitution in planar lipid bilayers of a Ca^{++} -dependent K^{+} channel from transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 805-809.
- Läuger, P. und Stark, G. (1970).
Kinetics of carrier-mediated ion transport across lipid bilayer membranes.
Biochim. Biophys. Acta 211: 458-466.
- Läuger, P. (1972).
Carrier-mediated ion transport.
Science 178: 24-30.
- Läuger, P. (1983).
Conformational transitions of ionic channels. In: Single Channel Recording (Sakmann, B. und Neher, E., eds.). Plenum Press, London, pp. 177-189.
- Lehninger, A.L. (1974).
Bioenergetik. Molekulare Grundlagen der biologischen Energieumwandlungen.
Thieme Verlag, Stuttgart.
- Lehninger, A.L. (1977).
Biochemie.
Verlag Chemie, Weinheim, New York.
- Levinson, S.R. und Meves, H. (1975).
The binding of tritiated tetrodotoxin to squid giant axons.
Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 270: 349-352.
- Lewis, C.A. und Stevens, C.F. (1983).
Acetylcholine receptor channel ionic selectivity: ions experience an aqueous environment.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 6110-6113.

- Maelicke, A. (1984).
Biochemische Aspekte der cholinergen Reizung.
Angew. Chemie 96: 193-226.
- Martinez, C., Lazdunski, C. und Pattus, F. (1983).
Isolation, molecular and functional properties of the C-terminal domain of colicin A.
EMBO J. 2: 1501-1507.
- Mayer, M.M. (1972).
Mechanism of cytolysis by complement.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2954-2959.
- Menestrina, G. und Antolini, R. (1979).
A different kind of hemocyanin channel in oxidized cholesterol membranes.
Biochim. Biophys. Res. Comm. 88: 433-439.
- Menestrina, G. und Pasquali, F. (1985).
Reconstitution of the complement channel into lipid vesicles and planar bilayers starting from the fluid phase complex.
Bioscience Reports 5: 129-136.
- Menestrina, G. (1986).
Ionic channels formed by Staphylococcus aureus alpha-toxin: voltage dependent inhibition by di and tri-valent cations.
J. Membr. Biol. 90: 177-190.
- Methfessel, C. und Boheim, G. (1982).
The gating of single calcium-dependent potassium channels is described by an activation/blockade mechanism.
Biophys. Struct. Mech. 9: 35-60.
- Methfessel, C. (1983).
Statistische Analyse von Einzelkanal-Fluktuationen am Beispiel des Calcium-abhängigen Kalium-Kanals von kultivierten embryonalen Skelettmuskelzellen der Ratte. Dissertation.
Abteilung für Biologie, Ruhr-Universität Bochum.
- Meyer, P. und Reusser, F. (1967).
A polypeptide antibacterial agent isolated from Trichoderma viride.
Experientia 23: 85-86.
- Michaels, D.W. (1979).
Membrane damage by a toxin from the sea anemone Stoichactis helianthus. I. Formation of transmembrane channels in lipid bilayers.
Biochim. Biophys. Acta 555: 67-78.

- Miller, C. und Racker, E. (1976).
Ca⁺⁺-induced fusion of fragmented sarcoplasmatic reticulum with artificial planar bilayers.
J. Membr. Biol. 30: 283-300.
- Miller, C., Arvan, P., Telford, J.N. und Racker, E. (1976).
Calcium-induced fusion of proteoliposomes: dependence on transmembrane osmotic gradient.
J. Membr. Biol. 30: 271-282.
- Misler, S. (1983).
Gating of ion channels made by a diphteria toxin fragment in phospholipid bilayer membranes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4320-4324.
- Misler, S. (1984).
Diphteria toxin fragment channels in lipid bilayer membranes. Selective sieves or discarded wrappers?
Biophys. J. 45: 107-109.
- Moczydlowski, E., Garber, S.S. and Miller, C. (1984).
Batrachotoxin-activated Na⁺-channels in planar lipid bilayers. Competition of tetrodotoxin block by Na⁺.
J. Gen. Physiol. 84: 665-686.
- Montal, M. und Mueller, P. (1972).
Formation of bimolecular membranes from lipidmonolayers and a study of their electrical properties.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 3561-3566.
- Montal, M., Suarez-Isla, B.A., Wan, K. und Lindstrom, J. (1983).
Single channel recordings from purified acetylcholine receptor reconstituted in bilayers formed at the tip of patch pipettes.
Biochemistry 22: 2319-2323.
- Morlon, J., Lloubes, R., Chartier, M., Bonicel, J. und Lazdunski, C. (1983 a).
Nucleotide sequence of promoter, operator and amino-terminal region of *caa*, the structural gene of colicin A.
EMBO J. 2: 787-789.
- Morlon, J., Lloubes, R., Varenne, S., Chartier, M. und Lazdunski, C. (1983 b).
Complete nucleotide sequence of the structural gene for colicin A, a gene translated at non-uniform rate.
J. Mol. Biol. 170: 271-285.

- Mueller, P., Rudin, D.O., Ti Tien, H. und Wescott, W.C. (1962).
Reconstitution of a cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system.
Nature 194: 979-980.
- Mueller, P. und Rudin, D.O. (1963).
Induced excitability in reconstituted cell structure.
J. Theor. Biol. 4: 268-280.
- Mueller, P. und Rudin, D.O. (1967).
Development of K^+ - Na^+ discrimination in experimental bimolecular lipid membranes by macrocyclic antibiotics.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 26: 398-410.
- Mueller, P. und Rudin, D.O. (1968).
Action potentials induced in bimolecular lipid membranes.
Nature 217: 713-719.
- Müller-Eberhard, H.H. (1975).
Complement.
Ann. Rev. Biochem. 44: 697-723.
- Nägeli, K.W. (1884).
Mechanisch-Physiologische Theorie der Abstammungslehre.
Oldenbourg, München.
- Neher, E. (1974).
Elektronische Meßtechnik in der Physiologie.
Springer-Verlag, Berlin.
- Neher, E. und Sakmann, B. (1976).
Single channel currents from membrane of denervated frog muscle fibres.
Nature 260: 779-802.
- Neher, E. und Stevens, C.F. (1977).
Conductance fluctuations and ionic pores in membranes.
Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 6: 345-381.
- Neher, E. (1980).
Messungen von Ionenströmen durch einzelne Membranporen in Muskel- und Nervenzellen. Habilitationsschrift.
Universität Göttingen.
- Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Furatani, Y., Hirobe, I., Asai, M., Inayama, T. und Numa, S. (1982).
Primary structure of α -helical subunit precursor of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence.
Nature 299: 793-797.

- Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Kikuyotani, S., Hirose, T., Asai, M., Takashima, H., Inayama, S., Miyata, T. und Numa, S. (1983 a).
Primary structures of β - and δ -subunit precursors of Torpedo californica receptor deduced from cDNA sequences.
Nature 301: 251-255.
- Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, R., Toyosato, M., Kikuyotani, S., Furutani, Y., Hirose, T., Takashima, H., Inayama, S., Miyata, T. und Numa, S. (1983 b).
Structural homology of Torpedo californica acetylcholine receptor subunits.
Nature 302: 528-532.
- Noda, M., Shimizu, T., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanako, Y., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H., Raftery, M.A., Hirose, T. und Inayama, S. (1984).
Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from c-DNA sequence.
Nature 312: 121-127.
- Odenthal, K.P., Mengs, R. und Seeger, R. (1976).
Acute toxic effects of the haemolysin from Amanita rubescens after i.v. injection in rats.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Suppl. 294: R24.
- Ohno-Ywashita, Y. und Imahori, K. (1982).
Assignment of the functional loci in the colicin E1 molecule by characterization of its proteolytic fragments.
J. Biol. Chem. 257: 6446-6451.
- Overton, E. (1902).
Beiträge zur allgemeinen Muskel- und Nervenphysiologie.
Pflügers Arch. 92: 115-280.
- Pal, R., Barenholz, Y. und Wagner, R.R. (1981).
Pardaxin, a hydrophobic toxin of the red sea flatfish, disassembles the intact membrane of vesicular stomatitis virus.
J. Biol. Chem. 256: 10209-10212.
- Pant, H.C. und Conran, P. (1972).
Keyhole limpet hemocyanin (KLH)-lipid bilayer membrane (LBM) interaction.
J. Membr. Biol. 8: 357-362.

- Parak, F., Frolov, E.N., Mössbauer, R.L. und Goldanskii, V.I. (1981).
Dynamics of metmyoglobin crystals investigated by nuclear gamma
resonance adsorption.
J. Mol. Biol. 145: 825-833.
- Pattus, F., Cavard, D., Verger, R., Lazdunski, C., Rosenbusch, J. und
Schindler, H. (1983 a).
Formation of voltage dependent pores in planar bilayers by
colicin A. In: Physical Chemistry of Transmembrane Ion Motions
(Spach, G. ed.).
Elsevier, Amsterdam, pp. 407-413.
- Pattus, F., Martinez, M.C., Dargent, B., Cavard, D., Verger, R. und
Lazdunski, C. (1983 b).
Interaction of colicin A with phospholipid monolayers and
liposomes.
Biochemistry 22: 5698-5703.
- Pattus, F., Heitz, F., Martinez, C., Provencher, S.W. und Lazdunski, C.
(1985).
Secondary structure of the pore-forming colicin A und its C-
terminal fragment. Experimental fact and structure prediction.
Eur. J. Biochem. 152: 681-689.
- Pfeffer, W.F.P. (1899).
Osmotische Untersuchungen.
Engelman, Leipzig.
- Popot, J.-L., Sugiyama, H. und Changeux, J.-P. (1976).
Studies on the electrogenic action of acetylcholine with
Torpedo marmorata electric organ.
J. Mol. Biol. 106: 469-483.
- Popot, J.-L. und Changeux, J.-P. (1984).
Nicotinic receptor of acetylcholine: structure of an oligomeric
integral membrane protein.
Physiol. Rev. 64: 1162-1239.
- Raymond, L., Slatin, S.L. und Finkelstein, A. (1985).
Channels formed by colicin E1 in planar lipid bilayers are
large and exhibit pH-dependent ion selectivity.
J. Membr. Biol. 84: 173-181.
- Reynolds, J. und Karlin, A. (1978).
Molecular weight in detergent solution of acetylcholine
receptor from Torpedo californica.
Biochemistry 17: 2035-2038.

- Robertson, J.D. (1959).
The ultrastructure of cell membrane and their derivatives.
Biochem. Sym. 16: 3-43.
- Robertson, J.D. (1960).
The molecular structure and contact relationship of cell membranes.
Prog. Biophys. 10: 343-418.
- Sakmann, B., Patlak, J. und Neher, E. (1980).
Single acetylcholine-activated channels show burst-kinetics in presence of desensitizing concentrations of agonist.
Nature 286: 71-73.
- Sakmann, B. und Neher, E., eds. (1983).
Single Channel Recording.
Plenum Press, London.
- Sakmann, B. und Trube, G. (1984).
Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart.
J. Physiol. 347: 641-657.
- Sakmann, B., Methfessel, C., Mishina, M., Takahashi, T., Takai, T., Kurasaki, M., Fukuda, K. und Numa, S. (1985).
Role of acetylcholine receptor units in gating of the channel.
Nature 318: 538-543.
- Sandvig, K. und Olsnes, S. (1981).
Rapid entry of nicked diphtheria toxin into cells at low pH.
J. Biol. Chem. 256: 9068-9076.
- Schein, S., Kagan, B. und Finkelstein, A. (1978).
Colicin K acts by forming voltage dependent channels in phospholipid bilayer membranes.
Nature 276: 159-163.
- Schindler, H. und Feher, G. (1976).
Branched bimolecular lipid membranes.
Biophys. J. 16: 1109-1113.
- Schindler, H. und Rosenbusch, J.P. (1978).
Matrix protein from Escherichia coli outer membranes forms voltage-controlled channels in lipid bilayers.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3751-3755.

- Schindler, H. und Schuerholz, Th. (1983).
Formation of lipid-protein bilayers by micropipette guided contact of two monolayers.
FEBS Lett. 152: 187-190.
- Schmidt, J. und Raftery, M.A. (1974).
Cation selectivity of the acetylcholine receptor from *Torpedo californica*.
J. Neurochem. 23: 617-623.
- Schwarz, G. und Savko, P. (1982).
Structural and dipolar properties of the voltage dependent pore former alamethicin in octanol/dioxane.
Biophys. J. 39: 211-219.
- Seeger, R. und Lehmann, D. (1973).
Tumorhemmende Wirkung vom Phallolysin aus *Amanita phalloides*.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 279: 235-242.
- Seeger, R., Kraus, H. und Wiedmann, R. (1973).
Zum Vorkommen von Hämolytinen in Pilzen der Gattung *Amanita*.
Arch. Toxikol. 30: 215-226.
- Seeger, R. (1976).
Purification and some properties of the haemolysin from *Amanita rubescens*.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 294: R25.
- Seeger, R. und Burkardt, M. (1976).
The haemolytic effect of phallolysin.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 293: 163-170.
- Seeger, R. (1980 a).
Studies on rubescenslysin haemolysis.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 311: 95-103.
- Seeger, R. (1980 b).
Cytolytic toxins of basidiomycetes. In: Natural Toxins (Eaker, D. und Wadström, T., eds.).
Pergamon Press, Oxford, pp. 165-172.
- Seeger, R. und Wachter, B. (1981).
Rubescenslysin and phallolysin release marker molecules from phospholipid cholesterol liposomes.
Biochim. Biophys. Acta 645: 59-62.

- Seitz, J., Adler, G., Stofft, E. und Faulstich, H. (1981).
The mechanism of cytolysis of erythrocytes by the mushroom toxin phallolysin. Morphological and biochemical evidence for sodium influx and swelling.
Eur. J. Cell Biol. 25: 46-53.
- Shemyakin, M.M., Ovchinnikov, Yu.A., Ivanow, V.T., Antonov, V.K., Vinogradova, E.I., Shkrob, A.M., Malenkov, G.G., Evstratov, A.V., Laine, I.A., Melnik, E.I. und Ryabova, I.E. (1969).
Cyclodepsipeptides as chemical tools for studying ionic transport through membranes.
J. Membr. Biol. 1: 402-430.
- Shin, M.L., Michaels, D.W. und Mayer, M.M. (1979).
Membrane damage by a toxin from the sea anemone *Stoichactis helianthus*. II. Effect of membrane lipid composition in a liposome system.
Biochim. Biophys. Acta 555: 79-88.
- Sigworth, F.J. (1983).
Electronic design of the patch clamp. In: *Single Channel Recording* (Sakmann, B. und Neher, E., eds.).
Plenum Press, London, pp. 3-35.
- Singer, S.J. und Nicolson, G.L. (1972).
The fluid mosaic model of the structures of membranes.
Science 175: 720-731.
- Singer, S.J. (1974).
The molecular organization of membranes.
Ann. Rev. Biochem. 43: 805-830.
- Skehel, J.J., Bayley, P.M., Brown, E.B., Martin, S.R., Waterfield, M.D., White, J.M., Wilson, J.A. und Wiley, D.C. (1982).
Changes in the conformation of influenza virus hemagglutinin at the pH optimum of virus-mediated membrane fusion.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 968-972.
- Stoeckenius, W. und Engelman, D.M. (1967).
Current models for the structure of biological membranes.
J. Cell Biol. 42: 613-646.
- Tank, D., Miller, C. und Webb, W.W. (1982).
Isolated patch recording from liposomes containing functionally reconstituted chloride channels from *Torpedo* electroplax.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 7749-7754.

- Thompson, S.H. und Aldrich, R.W. (1980).
Membrane potassium channels. In: The Cell Surface and Neuronal Function; Cell Surfaces Reviews, Vol. 6 (Cotman, C.W., Poste, G. und Nicolson, G.L., eds.).
North-Holland, Amsterdam, pp. 49-85.
- Tobkes, N., Wallace, B.A. und Baylay, H. (1985).
Secondary structure and assembly mechanism of an oligomeric channel protein.
Biochemistry 24: 1915-1920.
- Tokuda, H. und Konisky, J. (1978).
In vitro depolarisation of Escherichia coli membrane vesicles by colicin Ia.
J. Biol. Chem. 253: 7731-7737.
- Urry, D. (1971).
The gramicidin A channel: a proposed $\pi(L,D)$ helix.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68: 672-676.
- Urry, D.W., Alonso-Romanowski, S., Venkatachalam, C.M., Trapane, T.L. und Prasad, K.U. (1984).
The source of the dispersity of gramicidin A single channel conductances. The L-Leu⁵-gramicidin A analog.
Biophys. J. 46: 259-266.
- Van Dijk, P.W.M., de Kruijff, B., Verkleij, A.J., Van Deenen, L.L.M. und de Gier, J. (1978).
Comparative studies on the effects of pH and Ca²⁺ on bilayers of various negatively charged phospholipids and their mixtures with phosphatidylcholine.
Biochim. Biophys. Acta 512: 84-96.
- Varanda, W. und Finkelstein, W. (1980).
Ion and nonelectrolyte permeability properties of channels formed in planar lipid bilayer membranes by the cytolytic toxins from the sea anemone *Stoichactis helianthus*.
J. Membr. Biol. 55: 203-211.
- Verkleij, A.J., Zwaal, R.F.A., Roelofsen, B., Confurius, P., Kastelijn, K. und Van Deenen, L.L.M. (1973).
The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane.
Biochim. Biophys. Acta 323: 178-193.
- von Heijne, G. und Blomberg, C. (1979).
Trans-membrane translocation of proteins. The direct transfer model.
Eur. J. Biochem. 97: 175-181.

- Weis, M.J. und Luria, S.E. (1978).
Reduction of membrane potential, an immediate effect of colicin K.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 2483-2487.
- White, J. und Helenius, A. (1980).
pH-dependent fusion between the Semliki Forest virus membrane and liposomes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 3273-3277.
- Wieland, T. und Faulstich, H. (1978).
Amatoxins, phallotoxins, phallolysin and antamanide: the biological active components of poisonous mushrooms.
Crit. Rev. Biochem. 5: 185-260.
- Wilmsen, H.U. (1983).
Rekonstitution biologischer Kanalproteine in planaren Lipidmembranen unter Verwendung feuerpolierter Glaspipetten - Untersuchungen zur Protonen- und Spannungsabhängigkeit des Phallolysinkanals. Diplomarbeit.
Abteilung für Biologie, Ruhr-Universität Bochum.
- Wilmsen, H.U., Methfessel, C., Hanke, W. und Boheim, G. (1983).
Channel current fluctuation studies with solvent free lipid bilayers using Neher-Sakmann pipettes. In: Physical Chemistry of Transmembrane Ion Motion (Spach, G., ed.).
Elsevier, Amsterdam, pp. 479-485.
- Wilmsen, H.U., Faulstich, H., Eibl, H. und Boheim, G. (1985).
Phallolysin, a mushroom toxin, forms proton and voltage gated membrane channels.
Eur. Biophys. J. 12: 199-209.
- Yamada, M., Ebina, Y., Miyata, T., Nakazawa, T. und Nakazawa, A. (1982).
Nucleotide sequence of the structural gene for colicin EI and predicted structure of the protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 2827-2831.
- Yantorno, R.E., Takashima, S. und Mueller, P. (1982).
Dipole moment of alamethicin as related to voltage-dependent conductance in lipid bilayers.
Biophys. J. 38: 105-110.
- Zingsheim, H.P., Barrantes, F.J., Frank, J., Hänicke, W. und Neugebauer, D.-C. (1982).
Direct structural localization of two toxin-recognition sites on an ACh receptor protein.
Nature 299: 81-84.

L e b e n s l a u f

Persönliche Daten

Name	Hans Ulrich Wilmsen
geboren am	25.5.1956 in Essen
Familienstand	ledig

Schulausbildung

1963-1967	Volksschule in Essen
1967-1976	Alfred-Krupp-Schule in Essen, Reifeprüfung am 31.5.1976

Wehrdienst

1976-1977	Grundwehrdienst in Coesfeld/Westfalen
-----------	---------------------------------------

Studium

1977-1983	Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
1983	Diplom in Biologie
seit 1983	Promotion an der Ruhr-Universität Bochum

Herrn Prof. Dr. G. Boheim danke ich herzlich dafür, daß er mir einen Arbeitsplatz zur Verfügung stellte, meine Arbeit sachkundig und verständnisvoll betreute und stets zu einer hilfreichen Diskussion bereit war.

Herrn Prof. Dr. H. Faulstich vom Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung in Heidelberg bin ich zu Dank verpflichtet, weil er die kanalbildenden Substanzen zur Verfügung stellte und mir Gelegenheit gab, in seinem Labor zu arbeiten.

Viele Mitarbeiter des Lehrstuhls haben mich hilfreich unterstützt.

Mein besonderer Dank gebührt nicht zuletzt:

S. Abhoff, H. Bartel, B. Borutta, Dr. S. Gelfert-Peukert,
Dr. W. Hanke, I. Helbig, R. Krumm, Dr. C. Methfessel und
J. Zwoycyk.

